



# Codes transcriptionnels et expression du gène du récepteur de la GnRH au cours du développement et chez l'adulte

Anne-Laure Schang

## ► To cite this version:

Anne-Laure Schang. Codes transcriptionnels et expression du gène du récepteur de la GnRH au cours du développement et chez l'adulte. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T022 . tel-00633501

**HAL Id: tel-00633501**

**<https://theses.hal.science/tel-00633501>**

Submitted on 18 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année 2011

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie BIO-SigNE

présentée et soutenue publiquement  
par

**Anne-Laure Schang**

Le 1<sup>er</sup> Juin 2011

***Codes transcriptionnels  
et expression du gène du récepteur de la GnRH  
au cours du développement et chez l'adulte***

Directeur de thèse : M Jean-Noël Laverrière

**JURY**

<b>M Michael Schumacher</b>	Président
<b>M Youssef Anouar</b>	Rapporteur
<b>M Vincent Prévot</b>	Rapporteur
<b>M Jacques Epelbaum</b>	Examineur
<b>M Olivier Kah</b>	Examineur
<b>M Reiner Veitia</b>	Examineur
<b>M Jean-Noël Laverrière</b>	Examineur

*Je remercie vivement Monsieur Jean-Noël Laverrière, qui m'a encadrée et soutenue au cours de ce travail de thèse, me faisant profiter de ses hautes compétences scientifiques avec toute sa patience, sa gentillesse et sa générosité.*

*Je remercie également très sincèrement Monsieur Raymond Counis ainsi que Madame Joëlle Cohen-Tannoudji pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour leur accueil chaleureux, leur confiance et leur aide précieuse. Je suis reconnaissante à Monsieur le Professeur René Habert qui m'a conseillée et soutenue tout au long de mon cursus universitaire et m'a aiguillée vers ce laboratoire.*

*Je prie Monsieur Michael Schumacher, Professeur Responsable de l'Ecole Doctorale à laquelle je suis rattachée, qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse, de bien vouloir trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Youssef Anouar et Monsieur Vincent Prévot, Directeurs de Recherche à l'INSERM, d'avoir accepté tous deux la tâche de rapporteur. Connaissant leurs compétences dans le domaine de la Neuroendocrinologie, je leur suis extrêmement redevable et suis heureuse de pouvoir bénéficier de leurs remarques et critiques.*

*Je suis également très reconnaissante et honorée que Monsieur Reiner Veitia, Professeur à l'Université Paris 7, Monsieur Jacques Epelbaum, Directeur de Recherche à L'INSERM et Monsieur Olivier Kah, Directeur de Recherche au CNRS, aient accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Jean-Claude Jeanny pour nous avoir fourni les rétines de rat et de souris, ainsi que pour l'intérêt qu'il porte à ce projet. Je remercie également Madame Catherine Loudes pour sa collaboration à la réalisation des cultures primaires d'hippocampe.*

*Je remercie très chaleureusement Madame Marie-Claude Chenut pour son amical soutien, son extrême disponibilité, ses compétences multiples ainsi que pour sa contribution à la réalisation de ce projet de thèse.*

*Je tiens à remercier Madame Valérie Ngô-Muller, Madame Solange Magre et Monsieur Christian Bleux, dont les collaborations autant amicales que professionnelles m'ont permis également de mener à bien ce travail.*

*Enfin, j'exprime bien évidemment toute ma sympathie à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur soutien, leurs conseils et leur gentillesse.*

*Plus personnellement, je remercie Gilles pour sa force de caractère exceptionnelle et sa gentillesse, des qualités humaines rares qu'il a héritées de ses parents ; mes parents Hélène et Bernard, qui, tout naturellement, se sont révélés des grands-parents d'exception et m'ont apporté leur soutien inconditionnel. Sans oublier Emilie, Marie-Cécile et Amanda.*

*A Jeanne*

## Résumé

### ***Codes transcriptionnels et expression du gène du récepteur de la GnRH au cours du développement et chez l'adulte***

Le récepteur hypophysaire de la GnRH (RGnRH) et son ligand hypothalamique jouent un rôle crucial dans le contrôle de la fonction de reproduction, en régulant la synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes LH et FSH qui, à leur tour, stimulent la stéroïdogénèse et la gamétogenèse. Afin d'appréhender les mécanismes qui sous-tendent l'expression du gène du RGnRH (*Rgnrh*) de rat, la combinatoire transcriptionnelle responsable de l'activité de son promoteur dans les cellules gonadotropes hypophysaires a été partiellement décryptée au laboratoire. Elle comprend notamment les facteurs ubiquistes AP-1, CREB ainsi que le facteur stéroïdogénique SF1, qui interagissent avec la région proximale du promoteur. Une deuxième région distale, constituant un enhancer spécifique, participe de façon équivalente à l'activité promotrice. Dans la partie 3' de cet enhancer, un élément de réponse (LIRE) aux protéines LIM à homéodomaine (LIM-HD) ISL1 et LHX3 a été identifié. En accord avec ces données, l'étude d'une lignée murine, créée au laboratoire, exprimant la phosphatase alcaline placentaire humaine sous contrôle du promoteur du *Rgnrh* (*Rgnrh-hPLAP*), suggère l'implication des protéines LIM-HD *in vivo* dans l'émergence du *Rgnrh* au cours du développement hypophysaire. J'ai poursuivi le décryptage de cette combinatoire transcriptionnelle et découvert un second élément LIRE dans la région distale de l'enhancer (D-LIRE) qui, tout comme le premier élément, est activé spécifiquement par ISL1 et LHX3. Cet élément serait également la cible de GATA2, qui exerce probablement un contrôle inhibiteur. Dans ce contexte cellulaire, nous avons également identifié deux motifs TAAT impliqués dans la réponse aux facteurs Paired-like à homéodomaine, PROP1 et OTX2, facteurs qui, comme ISL1, LHX3 et GATA2, jouent un rôle crucial au cours de l'ontogenèse hypophysaire. Nos résultats pourraient ainsi contribuer à élucider certaines étapes qui président à l'émergence de l'expression du *Rgnrh* et à la différenciation terminale du lignage gonadotrope.

D'autre part, le RGnRH est exprimé dans plusieurs sites extra-hypophysaires incluant le cerveau, notamment l'hippocampe où cette expression est particulièrement élevée. L'étude de la cinétique d'expression du *Rgnrh* dans ce tissu a permis d'observer, pour la première fois, l'apparition puis l'augmentation de l'expression du transcrit du récepteur pendant le développement postnatal chez le rat. En outre, nous avons pu corréler ce résultat avec la cinétique d'expression du transgène dans l'hippocampe des souris *Rgnrh-hPLAP*, grâce auxquelles nous avons pu localiser cette expression dans une sous-population de neurones hippocampiques, et suivre ce marquage le long des projections hippocampo-septales. Les analyses supplémentaires que nous avons menées suggèrent en outre que le RGnRH modulerait la plasticité synaptique. Par ailleurs, grâce à ce modèle nous avons découvert deux nouveaux sites d'expression du récepteur, la rétine et la glande pinéale, qui participent conjointement à la synchronisation des rythmes biologiques chez les Mammifères. Dans ces divers sites, nous avons observé d'importantes différences entre les combinaisons spécifiques à chaque tissu et le code transcriptionnel gonadotrope. L'intégration de ces données pourrait contribuer à élaborer une interprétation physiologique, ontogénétique et/ou phylogénétique, susceptible d'expliquer pourquoi le RGnRH s'exprime spécifiquement dans ces différents organes et dans quelle mesure ces expressions sont liées à la fonction de reproduction.



## Table des matières

<b>I. LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>II. LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>10</b>
<b>III. INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Physiologie du système GnRH .....</b>	<b>18</b>
1.1 Physiologie du système GnRH mammalien hypophysaire.....	18
1.1.1. La GnRH hypothalamique .....	18
a. Structure et biosynthèse de la GnRH.....	18
b. Les neurones à GnRH.....	19
c. Pulsatilité de la sécrétion de GnRH.....	19
d. Régulation de la sécrétion de GnRH.....	21
1.1.2. Le RGnRH hypophysaire.....	24
a. Découverte et structure du RGnRH.....	24
b. Modèles d'étude du RGnRH : les lignées $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2.....	25
c. Signalisation, désensibilisation et effets associées au RGnRH mammalien dans l'hypophyse .....	27
1.1.3. Mutations de la GnRH mammalienne et de son récepteur .....	32
a. Mutations du gène de la GnRH .....	32
b. Mutations du gène du RGnRH .....	32
1.2 Des systèmes GnRH multiples chez les Métazoaires.....	33
1.2.1. Les systèmes GnRH chez les Chordés.....	33
1.2.2. Vers une disparition du système GnRH de type II chez les Mammifères .....	34
1.2.3. Des systèmes GnRH chez les non Vertébrés .....	35
<b>2. Le gène du RGnRH mammalien et sa régulation dans l'hypophyse.....</b>	<b>37</b>
2.1 Structure du <i>Rgnrh</i> .....	37
2.2 Régulation de l'expression du <i>Rgnrh</i> dans l'hypophyse.....	39
2.2.1. Variations au cours du cycle œstrien et effets de stéroïdes sexuels .....	39
2.2.2. Régulation homologue par la GnRH.....	40
2.2.3. Régulation par le couple activine/inhibine .....	40
2.3 Les approches <i>in vitro</i> et le décryptage des combinatoires transcriptionnelles ....	41
2.3.1. Le promoteur de souris.....	41
a. Expression constitutive .....	41
b. Expression régulée .....	42
2.3.2. Le promoteur de rat .....	45
a. Expression constitutive .....	45
b. Expression régulée .....	47

2.4	Les apports réciproques entre régulation d'expression génique et mécanismes du développement hypophysaire .....	48
2.4.1.	L'hypothèse de départ .....	48
2.4.2.	Les gradients morphogénétiques et la détermination des lignages anté-hypophysaires .....	49
2.4.3.	Premiers pas dans l'identification des facteurs de transcription impliqués dans le développement : découverte de PIT1 .....	51
2.4.4.	Exemples appliqués au <i>Rgnrh</i> : Les protéines LIM-HD et SF1 .....	51
a.	ISL1 et LHX3 .....	51
b.	SF1 .....	54
2.5	Analyse du promoteur du <i>Rgnrh</i> <i>in vivo</i> par transgénèse chez la souris .....	54
2.5.1.	Modèles créés par transgénèse additionnelle .....	54
2.5.2.	Modèle créé par transgénèse ciblée .....	56
<b>3.</b>	<b>Le récepteur de la GnRH hors de l'hypophyse .....</b>	<b>57</b>
3.1	Expression du RGnRH dans les organes reproducteurs .....	57
3.2	Expression du RGnRH dans les tissus périphériques non reproducteurs .....	60
3.3	Expression du RGnRH dans le système nerveux central .....	62
3.3.1.	Les neurones à GnRH .....	62
3.3.2.	L'hippocampe .....	63
3.4	Autres structures du SNC : cortex, cervelet, système olfactif, moelle épinière.....	65
3.5	Expression du RGnRH dans la rétine et la glande pinéale .....	66
3.6	Le système GnRH dans les cellules et tissus tumoraux .....	67
3.7	Rôles du système GnRH de type II .....	68
<b>IV.</b>	<b>OBJECTIFS GENERAUX .....</b>	<b>69</b>
<b>V.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>70</b>
1.	Article 1 : Core TAAT motifs confer to LIM Homeodomain proteins a predominant regulatory role over GATA factors in the cell-specific expression of the Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene .....	70
2.	Article 2 : GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity.....	106
3.	Article 3 : Identification and analysis of two novel sites of rat GnRH receptor gene promoter activity: the retina and pineal gland.....	123
4.	Article 4 : Reporter transgenic mouse models highlight the dual endocrine and neural facet of GnRH receptor function. ....	160
<b>VI.</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>168</b>
1.	Régulation du gène du <i>Rgnrh</i> dans l'hypophyse.....	168

1.1	Les apports de l'ontogenèse hypophysaire .....	168
1.1.1.	Les protéines LIM à homéodomaine .....	168
1.1.2.	FOXL2, une cible de LHX3 .....	172
1.1.3.	Les facteurs Paired-like à homéodomaine .....	173
a.	Facteurs PITX .....	175
b.	Facteurs OTX .....	176
c.	PROP1 .....	176
d.	Rôle des facteurs Paire-like dans l'expression du <i>Rgnrh</i> .....	177
1.1.4.	Les facteurs GATA .....	177
1.1.5.	SF1 .....	179
1.2.	Caractéristiques des mécanismes régulant l'ontogenèse de la fonction gonadotrope et l'expression du <i>Rgnrh</i> .....	180
1.2.1.	Redondance et robustesse .....	180
1.2.2.	Combinatoire transcriptionnelle : exemple du code LIM .....	181
<b>2.</b>	<b>Sites extra-hypophysaires d'expression du <i>Rgnrh</i> .....</b>	<b>185</b>
2.1.	Expression du <i>Rgnrh</i> dans l'hippocampe .....	185
2.1.1.	Caractéristiques spatio-temporelles de l'expression du <i>Rgnrh</i> dans l'hippocampe .....	185
2.1.2.	Régulation hippocampique de l'expression du <i>Rgnrh</i> .....	186
2.1.3.	Rôles potentiels du système GnRH dans l'hippocampe .....	187
2.1.4.	Source de GnRH .....	193
2.2.	Expression du <i>Rgnrh</i> dans la rétine et la glande pinéale .....	193
2.3.	Autres sites d'expression du transgène .....	196
2.4.	Intérêts et limites du modèle transgénique <i>Rgnrh-hPLAP</i> .....	198
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>204</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANNEXE : table des facteurs de transcription .....</b>	<b>207</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>208</b>

## I. LISTE DES ABREVIATIONS

- Les protéines désignées par des initiales sont indiquées en majuscules (RGnRH, OTX2). Les gènes sont indiqués en italiques, débutant par une majuscule (*Rgnrh*, *Otx2*) ou en majuscules pour les gènes humains (*RGnRH*, *OTX2*).
- Pour les facteurs de transcription, se reporter à l'annexe (VII).

<b>ACTH</b>	Adrenocorticotrophic Hormone
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AP-1</b>	Activator Protein 1 (dimère c-FOS/c-JUN)
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>AVPV</b>	Noyau antéro-ventral périventriculaire
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>CA</b>	Corne d'Ammon (hippocampe)
<b>cGnRH-II</b>	Chicken GnRH de type II
<b>CHO</b>	Lignée ovarienne de hamster chinois : Chinese Hamster Ovary
<b>COS</b>	Lignée rénale d'origine simienne (CV-1) transformée par SV40 : CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material
<b>CRE</b>	cAMP Response Element
<b>Cyp19</b>	Gène codant l'aromatase (Cytochrome P450 famille 19, sous-famille A, polypeptide 1)
<b>DARE</b>	Downstream Activin Regulatory Element
<b>E</b>	jour de développement embryonnaire
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>eGFP</b>	Enhanced Green Fluorescent Protein
<b>EMSA</b>	Electromobility Shift Assay : gel retard ou retardement sur gel
<b>ENU</b>	N-Ethyl-N-nitrosurée
<b>ER</b>	Récepteur des œstrogènes
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FSH</b>	Follicle-Stimulating Hormone
<b>GABA</b>	Acide γ-aminobutyrique
<b>GAP</b>	GnRH-Associated Peptide
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>G-GH3</b>	Lignée GH3 transfectée de façon stable par l'ADNc du <i>Rgnrh</i> de rat
<b>GH</b>	Growth Hormone
<b>GH3</b>	Lignée somatolactotrope de rat
<b>GMPc</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>GnIH</b>	Gonadotrophin Inhibitory Hormone
<b>GnRH</b>	Gonadotrophin Releasing Hormone
<b>GnSE</b>	GnRH receptor Specific Enhancer (= enhancer distal)

<b>GT1</b>	Lignée immortalisée de neurones à GnRH murins
<b>GPCR / GPR</b>	Récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G : G protein-coupled receptor
<b>HBHb</b>	Hélice-boucle-hélice basique : basic helix-loop-helix
<b>hCG</b>	gonadotrophine chorionique humaine
<b>HEK 293</b>	Lignée humaine rénale embryonnaire : Human Embryonic Kidney
<b>HeLa</b>	Lignée humaine provenant d'une métastase d'un cancer du col de l'utérus
<b>HH</b>	Hypogonadisme hypogonadotrope
<b>HHG</b>	(axe) hypothalamo-hypophyso-gonadique
<b>HHIn</b>	Hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique normosmique
<b>hPLAP</b>	Phosphatase alcaline placentaire humaine : human Placental Alkaline Phosphatase
<b>HTR-8/SVneo</b>	Lignée humaine dérivée de trophoblaste extra-villeux
<b>IP3</b>	inositol 1,4,5-triphosphate
<b>JEG-3</b>	Lignée placentaire humaine
<b>kb</b>	kilobases
<b>LacZ</b>	Gène codant la $\beta$ -galactosidase
<b>LBD</b>	LHX3 Binding Domain
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>LIM</b>	(Domaine) LIN11-ISL1-MEC3
<b>LIM-HD</b>	(Protéine) LIM à homéodomaine
<b>LIRE</b>	LIM Response Element (D-LIRE : Distal / P-LIRE : Proximal)
<b>LTP</b>	Potentialisation à long terme : long term potentiation
<b>L<math>\beta</math>T2</b>	Lignée gonadotrope murine
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>MSH</b>	Melanocyte Stimulating Hormone
<b>M17</b>	Lignée de neuroblastome humain
<b>NLI</b>	Nuclear LIM interactor (Ldb1/CLIM2)
<b>NRS</b>	Nuclear Response Sequence
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOS-I</b>	NO synthase neuronale
<b>OVLT</b>	Organe vasculaire de la lame terminale
<b>P</b>	jour postnatal
<b>PACAP</b>	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
<b>PARE</b>	Pacap Response Element
<b>pb</b>	paires de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PKA / PKC</b>	Protéine Kinase A / C

<b>POU</b>	(Domaine) PIT-OCT-UNC
<b>PRL</b>	Prolactine
<b>REGF</b>	Recepteur de l'EGF
<b>RF-amide</b>	(motif) Arginine-Phénylalanine amidée
<b>RFRP</b>	RFamide Related Peptide
<b>RGnRH</b>	Récepteur de la GnRH
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction
<b>SAP</b>	SF1 Adjacent Protein
<b>SCN</b>	Noyau suprachiasmatique
<b>sGnRH</b>	salmon GnRH (type III)
<b>SH-SY5Y</b>	Lignée de neuroblastome humain
<b>siRNA</b>	petits ARN interférents (small interfering RNA)
<b>SMAD</b>	Mothers Against Decapentaplegic homolog
<b>StAR</b>	Steroidogenic Acute Regulatory protein
<b>SURG</b>	Sequence Underlying Response to GnRH
<b>SV40</b>	Simian virus 40
<b>TIMP</b>	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
<b>TRH / TRF</b>	Thyrotropin-releasing Hormone / Factor
<b>TSH</b>	Thyroid Stimulating Hormone
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein
<b>αGSU</b>	Sous-unité α des hormones glycoprotéiques (LH, FSH, TSH)
<b>αT3-1</b>	Lignée gonadotrope murine
<b><sup>125</sup>I-GnRH</b>	analogue de la GnRH marqué à l'iode 125

## II. LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Représentation du système hypothalamo-hypophysaire de Mammifère (**page 12**)
- Figure 2 :** Phylogénie simplifiée des Eumétazoaires et répartition de l'hypophyse et du système porte hypothalamo-antéhypophysaire (**page 15**)
- Figure 3 :** L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) (**page 16**)
- Figure 4 :** Structure du gène de la GnRH mammalienne (**page 20**)
- Figure 5 :** Structure du récepteur de la GnRH humain (**page 26**)
- Figure 6 :** Les multiples voies de signalisation associées au RGnRH dans la cellule gonadotrope (**page 29**)
- Figure 7 :** Répartition du système GnRH chez les Eumétazoaires (**page 36**)
- Figure 8 :** Structure du gène du RGnRH de type I (**page 38**)
- Figure 9 :** Le promoteur du *Rgnrh* murin (0,5 kb) (**page 43**)
- Figure 10 :** Le promoteur du *Rgnrh* de rat (1,1 kb) (**page 46**)
- Figure 11 :** Développement hypophysaire (**page 50**)
- Figure 12 :** Structure des protéines LIM à homéodomaine et de SF1 (**page 53**)
- Figure 13 :** Bilan des éléments caractérisés ou en cours d'étude sur le promoteur du *Rgnrh* de rat dans les cellules gonadotropes (**page 169**)
- Figure 14 :** Cladogramme des facteurs LIM murins (**page 171**)
- Figure 15 :** Effets de FOXL2 sur le promoteur du *Rgnrh* dans la lignée  $\alpha$ T3-1 (**page 174**)
- Figure 16 :** Comparaison des éléments de réponse aux facteurs LIM à homéodomaine sur les promoteurs de rat et de souris (**page 182**)
- Figure 17 :** Le code LIM dans la moelle épinière (**page 184**)
- Figure 18 :** Bilan des activités promotrices du *Rgnrh* observées dans l'hippocampe *in vivo* et *in vitro* (**page 188**)
- Figure 19 :** Expression de *Cyp19*, *Star* et *Lh $\beta$*  dans l'hippocampe en développement (**page 192**)
- Figure 20 :** Le système photoneuroendocrine (**page 195**)
- Figure 21 :** Alignement des régions proximales des promoteurs du *Rgnrh* de souris et de rat (**page 197**)
- Figure 22 :** Expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans le cerveau antérieur (**page 199**)
- Figure 23 :** Expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans les cerveaux moyen et postérieur (**page 200**)
- Figure 24 :** Expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans le nerf vague (X) (**page 201**)
- Figure 25 :** Perspectives : émergence et maintien des marqueurs de différenciation du lignage gonadotrope (**page 205**)

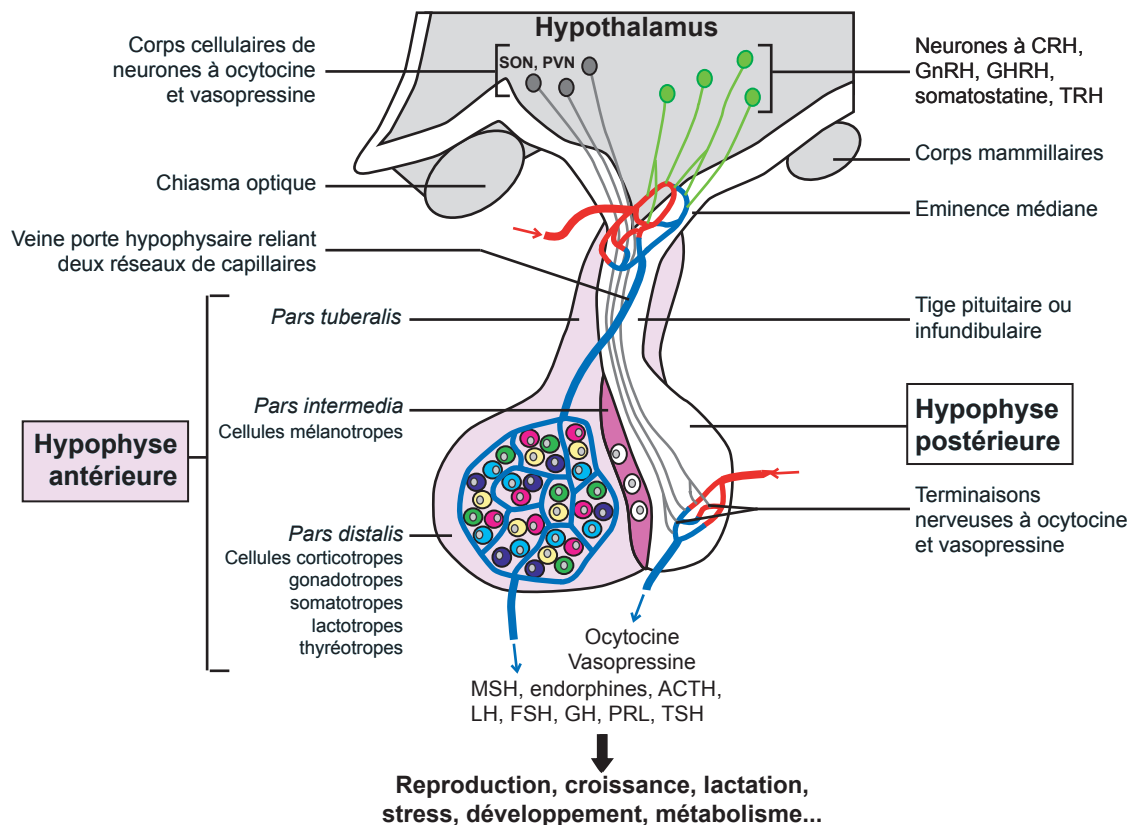
### III. INTRODUCTION GENERALE

L'hypophyse constitue une interface physique et fonctionnelle entre le système nerveux central et plusieurs organes assurant des fonctions essentielles à la survie de l'espèce et de l'individu comme la reproduction, la lactation, la croissance, la gestion du stress, le développement et de nombreux aspects du métabolisme général (**Figure 1**). Cette glande, située à la base du cerveau dans une cavité de l'os sphénoïde nommée selle turcique, est directement reliée à l'hypothalamus avec lequel elle constitue le système hypothalamo-hypophysaire.

Chez les Mammifères, l'hypophyse est composée de deux lobes de natures histologiques et d'origines embryologiques distinctes : un lobe antérieur glandulaire et un lobe postérieur nerveux (**Figure 1**). L'hypophyse postérieure, reliée à l'hypothalamus par l'éminence médiane et la tige pituitaire, a pour origine une évagination du plancher du diencephale. Elle contient essentiellement des cellules apparentées à la glie, les pituicytes, ainsi que des terminaisons nerveuses à vasopressine et ocytocine, hormones synthétisées dans les noyaux supraoptiques (SON) et paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus. L'hypophyse antérieure adulte est subdivisée en trois régions : la *pars distalis* constituant la région principale, la *pars tuberalis* remontant le long de la tige pituitaire (hypophysaire) et la *pars intermedia*, plus ou moins développée selon les espèces. Au cours du développement embryonnaire, l'hypophyse antérieure se développe à partir d'une invagination de l'ectoderme oral, la poche de Rathke. Ses cellules forment un tissu primordial où apparaissent progressivement les six lignages cellulaires endocrines typiques de l'hypophyse adulte : les cellules gonadotropes qui produisent à la fois la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicle-Stimulating Hormone), les cellules corticotropes, somatotropes, thyrotropes et lactotropes, qui libèrent respectivement l'ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone), la GH (Growth Hormone), la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) et la PRL (prolactine), et enfin les cellules mélanotropes, localisées dans la *pars intermedia*, qui produisent la MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) et des endorphines. Un septième type cellulaire non sécrétant, les cellules folliculo-stellaires, pourrait constituer un système de communication intercellulaire à longue distance (Fauquier *et al.*, 2001). Une hypothèse non exclusive propose que ces cellules soient des cellules souches capables de participer aux changements morphologiques importants observés dans l'hypophyse de l'animal adulte, notamment à la puberté (Inoue *et al.*, 2002).

L'activité endocrine de l'hypophyse antérieure est essentiellement régulée par des neurones hypothalamiques hypophysiotropes. L'un des aspects fondamentaux de ce modèle concerne l'architecture du complexe hypothalamo-hypophysaire et, plus particulièrement, les moyens par lesquels les neurosécrétions hypothalamiques atteignent leurs cellules cibles dans l'hypophyse. Chez les Mammifères et les Oiseaux, les neurosécrétions hypothalamiques sont déversées dans un réseau de capillaires sanguins situé dans l'éminence médiane, relié par une ou plusieurs veines portes hypophysaires à un second réseau irriguant l'hypophyse antérieure, l'ensemble constituant le système porte hypothalamo-hypophysaire (**Figure 1**). La découverte de ces mécanismes originaux s'est





**Figure 1 :**  
**Représentation du système hypothalamo-hypophysaire de Mammifère**

L'hypophyse est une glande composée de deux lobes de natures histologiques et d'origines embryologiques distinctes : un lobe postérieur nerveux et un lobe antérieur glandulaire, lui-même subdivisé en trois régions : la *pars distalis*, la *pars tuberalis* et la *pars intermedia*. L'hypophyse antérieure est composée de six types cellulaires endocrines : les cellules gonadotropes qui produisent à la fois la LH et la FSH, les cellules corticotropes, lactotropes, somatotropes et thyrotropes qui libèrent respectivement l'ACTH, la PRL, la GH et la TSH, et enfin les cellules mélanotropes qui produisent la MSH et des endorphines. L'hypophyse antérieure est reliée de façon indirecte à l'hypothalamus via le système porte hypothalamo-hypophysaire localisé dans l'éminence médiane, qui permet le transport de l'hypothalamus vers l'hypophyse antérieure des neurohormones régulant leur activité, notamment la GnRH, la CRH, la GHRH, la somatostatine et la TRH. L'hypophyse postérieure contient des terminaisons nerveuses à vasopressine et ocytocine, hormones qui sont synthétisées dans les noyaux supraoptiques (SON) et paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus.

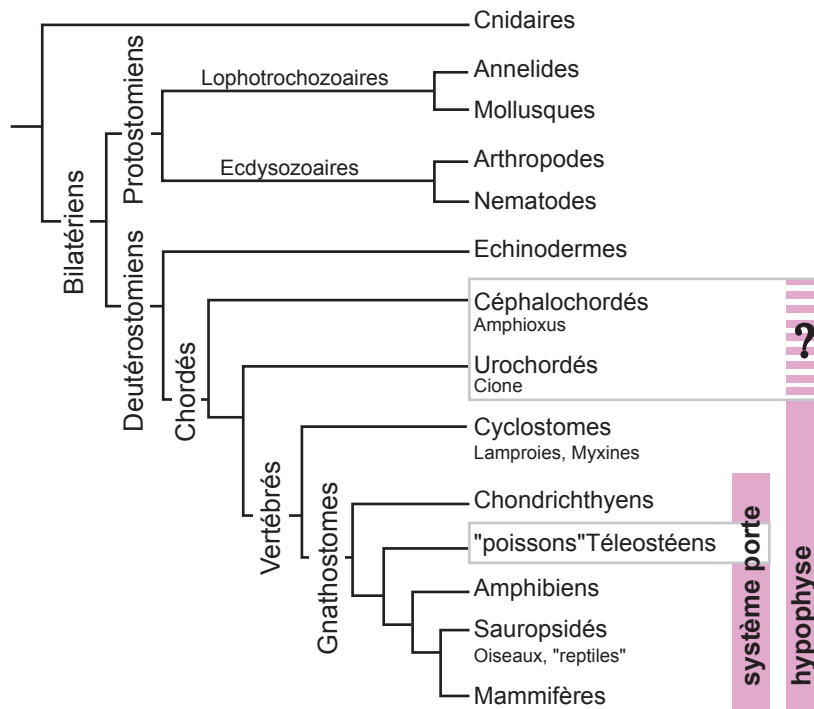
heurtée à plusieurs obstacles aussi bien d'ordre conceptuel que technique. Au début des années 1950, allant à l'encontre de la thèse encore répandue selon laquelle les cellules nerveuses communiquaient en transmettant des influx électriques, Geoffrey Harris (1913-1971) et Jacques Benoît (1896-1982) pressentirent puis mirent en évidence l'existence d'un contrôle chimique de l'activité anté-hypophysaire par l'hypothalamus. Chez le rat, le britannique Sir Geoffrey Harris réalisa des ablations totales d'hypophyse (antérieure et postérieure), et constata que la fertilité des femelles était restaurée après transplantation d'une hypophyse fœtale uniquement si elle était raccordée à la tige pituitaire, donc placée sous contrôle humoral hypothalamique (Harris et Jacobsohn, 1952). En France, Jacques Benoît utilisa le canard domestique chez lequel il parvint à rompre la communication vasculaire entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure sans affecter les fibres nerveuses transitant vers l'hypophyse postérieure, abolissant ainsi le réflexe photo-sexuel chez le mâle qui se traduit par une augmentation saisonnière de la taille des testicules (Benoît et Assenmacher, 1952). L'expérience inverse n'entraînant pas le même effet, il en conclut qu'un signal chimique hypothalamique stimulant l'axe gonadotrope parvenait à l'hypophyse *via* le système porte hypothalamo-hypophysaire, en l'absence de toute communication nerveuse. Ces expériences ont jeté les fondations d'une nouvelle discipline, la Neuroendocrinologie, que Claude Kordon (1934-2008) a élégamment définie comme "la science des interactions réciproques entre le cerveau et les hormones".

Il restait encore à identifier la nature chimique et à définir la structure des neurohormones hypothalamiques. Grâce au système porte qui court-circuite la circulation générale, ces molécules se retrouvent suffisamment concentrées dans l'hypophyse antérieure pour y réguler l'activité des cellules endocrines, même si elles sont produites en très faible quantité par les neurones hypothalamiques. Cette dernière particularité permet de mieux comprendre pourquoi l'identification de ces substances fut particulièrement longue et difficile. Leur recherche, débutée dans les années 1950, n'a commencé à porter ses fruits qu'en 1969 avec l'identification de la structure du facteur TRF (nommé TRH par la suite pour Thyrotropin-Releasing Hormone), et s'est poursuivie jusque dans les années 1980. Dans cette longue quête, Roger Guillemin et Andrew Schally se sont illustrés en recevant le Prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1977, après une lutte acharnée et plusieurs millions d'hypothalamus prélevés (respectivement chez le porc et le mouton). Ils partagèrent ce prix avec la physicienne Rosalyn Yalow, qui mit au point la méthode de dosage par radioimmunologie. Cette technique très sensible permit en effet de détecter et de doser des hormones présentes en quantités infimes dans les extraits hypothalamiques. Par contraste, l'ocytocine et la vasopressine post-hypophysaires, beaucoup plus abondantes, furent isolées et identifiées dès les années 1950 par Vincent Du Vigneaud, lauréat du prix Nobel de Chimie en 1955.

Entre les découvertes de J. Benoît et G. Harris, publiées dès 1952, et l'identification des dernières neurohormones hypothalamiques, la GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) et la CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), au début des années 1980, une trentaine d'années auront été nécessaires pour définir les grandes lignes du système hypothalamo-hypophysaire. Si cette course à la connaissance représente une véritable épopée à l'échelle humaine, elle fait figure d'anecdote dans le contexte de l'évolution. En 1973, le généticien Theodosius Dobzhansky publiait un

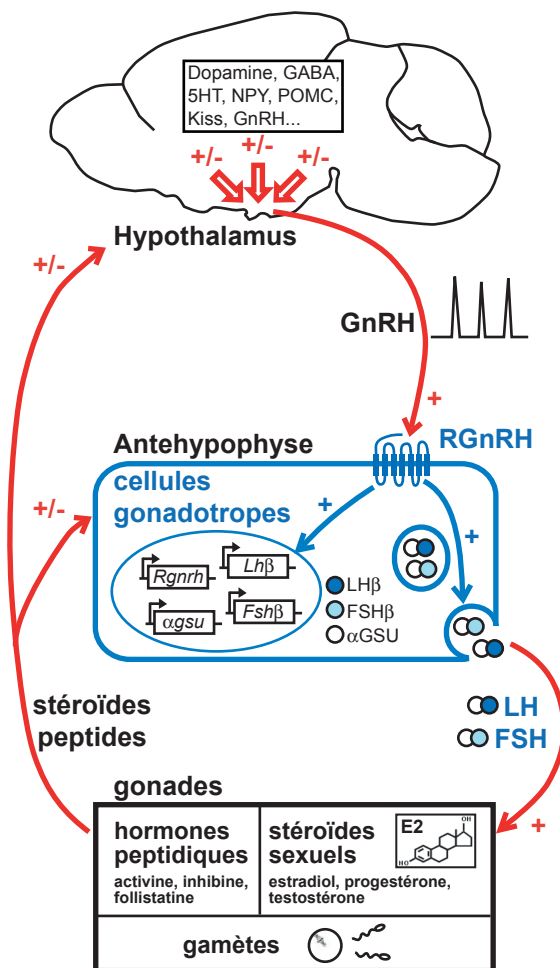
célèbre essai intitulé « Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. ». A l'instar des gènes du développement dont la découverte, dans les années 1980, impulsa l'essor d'une nouvelle discipline, la génétique évolutive du développement (Evo-dévo), retracer l'histoire évolutive du système hypothalamo-hypophysaire pourrait s'avérer utile pour mieux en appréhender le fonctionnement. L'hypophyse est présente dans tous les groupes de Vertébrés (**Figure 2**). L'existence d'un organe homologue à l'hypophyse a été suggérée chez les Chordés basaux (Candiani *et al.*, 2008), mais cette hypothèse est mise à mal par le fait que la plupart des gènes codant pour les hormones anté-hypophysaires sont manquants dans les génomes de la cione et d'amphioxus (Campbell *et al.*, 2004, Dos Santos *et al.*, 2009). En revanche, l'hypophyse est totalement absente chez les Protostomiens, rassemblant la majorité des animaux usuellement appelés invertébrés tels que les Arthropodes ou les Mollusques. Par ailleurs, le système porte hypothalamo-hypophysaire est présent chez les Vertébrés à mâchoires (Gnathostomes) à l'exception des poissons Téléostéens, chez lesquels les terminaisons axonales des neurones hypothalamiques innervent directement le tissu hypophysaire. Ceci suggère que l'hypophyse a émergé après la séparation entre Protostomiens et Deutérostomiens. Les données ambiguës obtenues jusqu'à présent chez les Chordés basaux suggèrent que l'apparition de l'hypophyse précède immédiatement l'émergence des Vertébrés. Le système porte serait, quant à lui, apparu après la séparation entre Cyclostomes et Gnathostomes, puis il aurait disparu secondairement chez les Téléostéens (Lovejoy, 2006). Au cours de l'évolution, le système hypothalamo-hypophysaire se serait ensuite modifié pour aboutir aux formes actuelles, en particulier celle décrite chez les Mammifères, capable d'intégrer des informations d'origines multiples et d'émettre des signaux hormonaux finement modulables.

Dans l'hypophyse de Mammifère adulte, le lignage gonadotrope représente 10 à 15% des cellules totales. Au cours du développement embryonnaire, les cellules gonadotropes se différencient dans la partie ventrale et rostrale de la poche de Rathke, puis se dispersent dans l'ensemble de l'hypophyse antérieure, où elles assurent la synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes LH et FSH. Le récepteur de la GnRH (RGnRH), exprimé à la surface de ces cellules, joue un rôle clé dans le contrôle de la fonction de reproduction en relayant la commande du système nerveux central via la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) hypothalamique (**Figure 3**) (Counis *et al.*, 2005). La GnRH, libérée de façon pulsatile dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire, se lie spécifiquement sur son récepteur et induit la synthèse et la libération des gonadotropines LH et FSH par les cellules gonadotropes. Ces hormones glycoprotéiques, composées chacune de l'association d'une sous-unité  $\alpha$  commune ( $\alpha$ GSU pour glycoprotein subunit) et d'une sous-unité  $\beta$  spécifique (LH $\beta$  ou FSH $\beta$ ) sont déversées dans la circulation générale et régulent la production des stéroïdes sexuels et des gamètes par les gonades. La LH induit l'ovulation et la formation du corps jaune chez les femelles et la sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig chez les mâles. La FSH stimule quant à elle la croissance folliculaire dans l'ovaire et la spermatogénèse dans le testicule. Les hormones stéroïdes et peptidiques sécrétées par les gonades exercent à leur tour un rétrocontrôle positif ou négatif sur le fonctionnement de la commande hypothalamo-hypophysaire. Ces trois niveaux constituent l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (ou axe HHG). Au cœur de cet axe, la spécificité gonadotrope de la réponse à la GnRH ainsi que son amplitude sont étroitement dépendantes de la présence et du



**Figure 2 :**  
**Phylogénie simplifiée des Eumétazoaires et répartition de**  
**l'hypophyse et du système porte hypothalamo-antéhypophysaire**

L'hypophyse est présente dans tous les groupes de Vertébrés. L'analyse des génomes de Chordés basaux (cione, amphioxus) a révélé l'absence de la plupart des gènes codant les hormones hypophysaires, suggérant l'absence totale d'hypophyse ou d'organe homologue dans ce groupe. Le système porte hypothalamo-hypophysaire est présent chez les Vertébrés à mâchoires (Gnathostomes) à l'exception des poissons Téléostéens, chez lesquels les terminaisons axonales des neurones hypothalamiques innervent directement le tissu hypophysaire.



**Figure 3 :**  
**L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG)**

La GnRH régule la sécrétion des gonadotropines FSH et LH en agissant sur les cellules gonadotropes via son récepteur spécifique, le RGNRH. A leur tour, les gonadotropines contrôlent la synthèse des stéroïdes et la formation des gamètes par les gonades. Les hormones gonadiques exercent un rétrocontrôle négatif aux niveaux hypothalamique et hypophysaire. L'estradiol exerce également un rétrocontrôle positif précédant le pic préovulatoire de LH au milieu de chaque cycle chez la femme. L'activine, l'inhibine et la follistatine sont des peptides synthétisés par l'hypophyse et les gonades qui agissent en tant que modulateurs des effets de la GnRH sur la cellule gonadotrope hypophysaire.

nombre de récepteurs à la surface cellulaire. Ces deux paramètres sont au moins en partie régulés au niveau transcriptionnel.

La régulation de l'expression du gène du RGnRH (*Rgnrh*) constitue le point de départ de ce travail de thèse. Plus précisément, j'ai poursuivi le décryptage des combinatoires transcriptionnelles régulant l'expression du *Rgnrh* de rat dans les cellules gonadotropes, contribuant ainsi à leur spécification fonctionnelle. Ce travail a débuté il y a plusieurs années par la délimitation de la région promotrice du *Rgnrh* nécessaire et suffisante pour diriger l'expression d'un gène rapporteur de façon spécifique dans des cellules gonadotropes (Pincas *et al.*, 1998). Afin de confirmer l'efficacité et la spécificité de cette région promotrice *in vivo*, un modèle de souris transgénique a été créé au laboratoire, exprimant le gène rapporteur de la phosphatase alcaline placentaire humaine (hPLAP) sous le contrôle du promoteur du *Rgnrh*. De façon à la fois inattendue et intéressante, chez ces souris, le transgène est exprimé non seulement dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure mais également dans plusieurs autres sites extra-hypophysaires (Granger *et al.*, 2004). L'expression du système GnRH hors de l'hypophyse avait déjà été mise en évidence antérieurement, notamment dans les gonades et le cerveau, essentiellement par des approches d'hybridation *in situ* et de liaison d'agoniste radiomarqué. Cependant, on pouvait s'attendre à ce qu'une région promotrice de taille assez limitée, de 3,3 kilobases (kb) au maximum, serait insuffisante pour diriger l'expression spécifique du transgène dans une grande variété de tissus, offrant des environnements très différents vis-à-vis du promoteur, en particulier concernant leurs équipements en facteurs de transcription. S'appuyant sur l'outil d'investigation puissant offert par ce modèle transgénique, l'étude de sites d'expression extra-hypophysaires du *Rgnrh* constitue le deuxième grand axe de mes travaux de recherche.

La GnRH mammalienne est un décapeptide dont la sécrétion, de type pulsatile, est soumise à de nombreuses régulations. Son partenaire, le RGnRH, appartient à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Chez les Mammifères, le RGnRH hypophysaire se distingue notamment par le fait qu'il ne possède pas la queue C-terminale intracytoplasmique impliquée dans la désensibilisation homologue des autres récepteurs de cette famille. Caractérisé en premier, le système GnRH de l'axe HHG mammalien n'est pas unique. Il existe en effet plusieurs GnRH et RGnRH répartis dans tout le règne animal y compris dans des organismes dépourvus d'hypophyse, suggérant une implication de ce couple dans des fonctions bien plus vastes que celles décrites dans l'axe HHG (Kah *et al.*, 2007). Ce constat pose également la question des processus évolutifs gouvernant l'émergence de nouveaux types cellulaires exprimant des gènes apparus antérieurement. Dans ce contexte, le décryptage des mécanismes impliqués dans l'expression spécifiquement gonadotrope du *Rgnrh* pourrait contribuer à éclaircir l'histoire évolutive de l'hypophyse antérieure. La correspondance étroite existant entre, d'une part, les facteurs trans-régulateurs exprimés par les cellules gonadotropes, et, d'autre part, les séquences cis-régulatrices présentes dans le promoteur du *Rgnrh*, permet l'expression spécifique de ce gène et participe ainsi à la fonctionnalité de ces cellules. La création de lignées cellulaires gonadotropes a été à l'origine d'avancées considérables dans l'identification de ces éléments. Une seconde partie, consacrée à la

régulation du promoteur du *Rgnrh* dans la cellule gonadotrope, permettra de présenter la combinatoire d'éléments impliqués dans l'expression basale de ce gène mais également dans sa régulation par différents facteurs. Complémentaires des approches *in vitro*, les études par transgénèse ont notamment permis de progresser dans l'étude de sites d'expression extra-hypophysaires du RGnRH, qui seront l'objet d'une troisième et dernière partie introductive. Au-delà des aspects relatifs à la régulation de l'expression du récepteur dans ces sites, se pose la question primordiale du rôle que pourrait y jouer le système GnRH et son lien éventuel avec la fonction de reproduction.

## **1. Physiologie du système GnRH**

Actuellement, plusieurs formes de GnRH et de son récepteur ont été décrites au sein des Métazoaires. La diversité des systèmes GnRH sera abordée après une description détaillée des premiers acteurs identifiées, la GnRH mammalienne et son récepteur hypophysaire (de type I).

### **1.1 Physiologie du système GnRH mammalien hypophysaire**

#### **1.1.1. La GnRH hypothalamique**

Outre leurs apports essentiels concernant l'anatomie des relations entre hypothalamus et hypophyse antérieure, les expériences de G. Harris et J. Benoît ont permis, dès les années 50, d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un facteur hypothalamique de libération des gonadotropines. Toutefois, du fait notamment de la présence d'acides aminés modifiés aux extrémités, des techniques de purification des protéines disponibles et de la quantité infime du peptide dans l'hypothalamus, ce n'est qu'en 1971 que fut élucidée la séquence de la GnRH de Mammifère par les groupes de R. Guillemin (Amoss *et al.*, 1971) et A. Schally (Matsuo *et al.*, 1971). Initialement caractérisée sur sa capacité à stimuler la sécrétion de LH, elle fut nommée successivement LRF, LRH puis LHRH (pour Luteinizing Hormone-Releasing Factor / Hormone). Compte tenu de sa capacité à stimuler également la sécrétion de FSH, elle fut dénommée plus tard GnRH ou gonadolibérine. Il fallut encore attendre plus de 20 ans pour connaître la structure de son récepteur.

#### **a. Structure et biosynthèse de la GnRH**

La GnRH mammalienne est un peptide de 10 acides aminés, de formule pyroGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-CONH<sub>2</sub>. Cette molécule forme une structure en épingle à cheveux, courbée au niveau de la glycine en position 6 et dont les deux extrémités N et C terminales

participent à l'interaction avec le RGNRH (pour revue : Millar *et al.*, 2004). Le gène codant la GnRH est organisé en quatre exons (I à IV) et trois introns (**Figure 4**). La traduction de l'ARN messager (ARNm) conduit à un peptide précurseur, la pré-pro-GnRH, comportant séquentiellement un peptide signal, le décapeptide GnRH, un site de clivage Gly-Lys-Arg et enfin un peptide GAP (GnRH-Associated Peptide). La maturation post-traductionnelle implique des clivages de la pré-pro-GnRH, l'élimination d'acides aminés basiques en C-terminal et la modification de la GnRH à ses deux extrémités, cyclisation de la glutamine N-terminale en pyroglutamate et amidation de la glycine C-terminale. La GnRH et le peptide GAP sont stockés ensemble dans les vésicules de sécrétion au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH (pour revue : Caraty *et al.*, 2001). Bien que son rôle physiologique reste encore à élucider, le peptide GAP paraît nécessaire à la production de GnRH mature, manquante chez les souris hpg (hypogonadiques hypogonadotropes), dont le gène est délété des exons III et IV codant une partie du peptide GAP (Mason *et al.*, 1986).

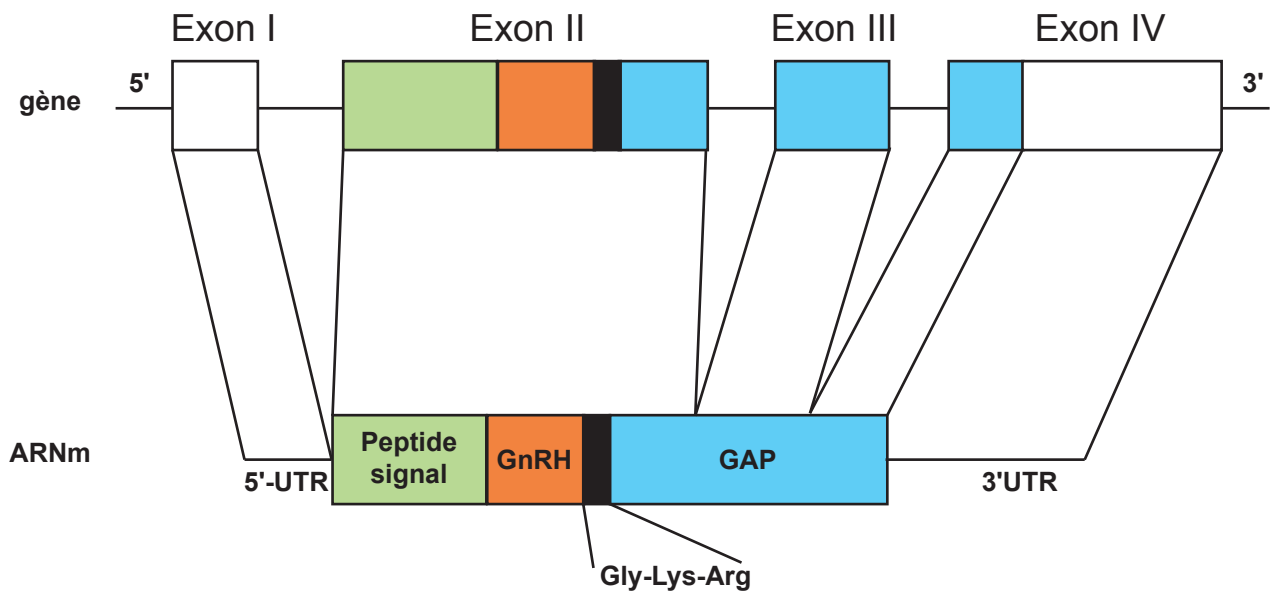
### **b. Les neurones à GnRH**

Au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle, un médecin espagnol, Aureliano Maestre de San Juan (1828-1890) fit la première description d'un homme atteint à la fois d'hypogonadisme et d'une agénésie des nerfs olfactifs. Un siècle plus tard, Franz Joseph Kallmann décrivait à son tour un syndrome associant hypogonadisme et anosmie (absence d'odorat). Cette pathologie révéla alors l'existence d'un lien entre le contrôle central de la fonction de reproduction et le système olfactif. En effet, les neurones à GnRH ne se différencient pas dans l'hypothalamus, mais ils le colonisent au cours du développement embryonnaire après avoir migré, depuis les placodes olfactives, à travers l'épithélium olfactif et le cerveau antérieur (Schwanzel-Fukada et Pfaff, 1989). Les neurones à GnRH sont, au final, assez peu nombreux, environ 800 chez les Rongeurs et jusqu'à 2000 chez l'humain, répartis de façon diffuse dans l'hypothalamus. Ils sont essentiellement localisés dans la région préoptique chez les Rongeurs, alors qu'ils sont plus nombreux dans l'hypothalamus médiobasal chez les Primates (pour revue : Beauvillain, 2008). Ils envoient massivement leurs projections vers l'éminence médiane où ils libèrent la GnRH dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire.

### **c. Pulsatilité de la sécrétion de GnRH**

La propagation de potentiels d'action dans les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH provoque l'exocytose des vésicules de sécrétion et la libération de leur contenu dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire. Des expériences réalisées notamment chez le macaque rhésus ont permis de démontrer l'importance du rythme de sécrétion de la GnRH dans le maintien de la fonction gonadotrope. En particulier, chez des singes atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope (HH) suite à l'ablation de leur hypothalamus ventro-médian, seule une injection intermittente de GnRH est capable de restaurer la sécrétion de LH et de FSH (Belchetz *et al.*, 1978). En revanche, une administration continue et massive de GnRH abolit la fonction gonadotrope. En outre, des dosages de GnRH dans le





**Figure 4 :**  
**Structure du gène de la GnRH mammalienne**

Le gène codant la GnRH mammalienne (mGnRH) est constitué de 4 exons et 3 introns. L'ARNm code pour une pré-pro-hormone composée d'un peptide signal, de la GnRH, d'un site de clivage Gly-Lys-Arg caractéristique d'une amidation enzymatique et enfin du GAP (GnRH Associated Peptide). La GnRH et le GAP sont issus de la maturation post-traductionnelle de la pré-pro-GnRH, la GnRH faisant l'objet à son extrémité N-terminale d'une cyclisation de la glutamine en pyroglutamate et de l'amidation de la glycine C-terminale. La GnRH et le GAP sont stockés ensemble dans des grains de sécrétion au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH.

système porte de mouton ont révélé que chaque pic plasmatique de LH est précédé d'un pic de GnRH dans le sang porte (Clarke and Cummins, 1982). La sécrétion pulsatile de GnRH s'opère *via* une rythmicité intrinsèque à chaque neurone et synchronisée des neurones à GnRH (Knobil, 1990). Chaque pulse de GnRH dure de quelques minutes à quelques dizaines de minutes, à intervalles variant généralement de 30 minutes à 2 heures. La fréquence des pulses joue un rôle déterminant dans l'activation sélective des voies de signalisation associées au récepteur et, par la suite, des effets biologiques induits, notamment sur l'expression des gènes des sous-unités des gonadotropines (voir § 1.1.2.c). Les découvertes sur le rôle du rythme de sécrétion de la GnRH ont eu un retentissement considérable en clinique humaine. Ainsi, la castration chimique par administration continue et massive d'agonistes de la GnRH est utilisée pour traiter des troubles endocrines tels que l'endométriose chez la femme (Cedars *et al.*, 1990) ou la puberté précoce (Boepple *et al.*, 1990, Lahlou *et al.*, 2000), mais également pour lutter contre les tumeurs hormono-dépendantes (Emons et Schally, 1994, Vacher, 1995). A l'inverse, une administration pulsatile de GnRH à des patients atteints d'HH (mais dont le RGnRH est fonctionnel, par exemple des patients atteints du syndrome de Kallmann) permet de restaurer la fonction gonadotrope (Pitteloud *et al.*, 2002).

#### **d. Régulation de la sécrétion de GnRH**

L'activité des neurones à GnRH est le résultat d'un équilibre dynamique intégrant des stimuli excitateurs et inhibiteurs, d'origine à la fois périphérique, centrale et locale.

##### **- Facteurs périphériques**

En leur double qualité de produits terminaux de l'axe HHG et de molécules signalisatrices circulantes, les hormones stéroïdes gonadiques (et, dans une moindre mesure, peptidiques) sont les principaux facteurs périphériques régulant la commande centrale de la fonction de reproduction. Leurs effets s'exercent à la fois sur l'activité des cellules gonadotropes et sur la sécrétion de GnRH. Chez les mâles, la testostérone, aromatisée en œstradiol, exerce un rétrocontrôle inhibiteur sur la sécrétion de GnRH. Ainsi, l'administration de testostérone exogène ralentit la fréquence des pulses de GnRH chez l'homme (Matsumoto et Bremner, 1984). Chez les femelles, l'œstradiol exerce un effet majoritairement inhibiteur sur la commande centrale de l'axe HHG, ainsi qu'un rétrocontrôle positif restreint à la période précédant le pic préovulatoire de LH et de FSH, qui correspond à la fin de phase folliculaire ou au proestrus chez les Rongeurs. Se pose alors la question d'une action directe de l'œstradiol sur les neurones à GnRH. L'un des éléments permettant de répondre partiellement à cette question est de déterminer si les neurones à GnRH expriment les récepteurs des œstrogènes (ER) (pour revue : Herbison et Pape, 2001). Jusqu'à la fin des années 90, différentes études avaient conclu à l'absence d'ER dans les neurones à GnRH. Un modèle de souris transgéniques permettant de repérer les neurones à GnRH par fluorescence dans une préparation de tissu vivant a été utilisé pour réaliser des expériences de RT-PCR sur cellule unique. L'expression du gène codant ER $\beta$  a ainsi été mise en évidence dans 20% des neurones à GnRH (Skynner *et al.*, 1999a, Herbison *et al.*, 2001). Ce

résultat est en accord avec des études par hybridation *in situ*, liaison d'agoniste marqué (Hrabovszky *et al.*, 2000) ainsi que par immunohistochimie chez le rat (Hrabovszky *et al.*, 2001) et l'homme (Hrabovszky *et al.*, 2007). Cependant, la répartition diffuse et le faible nombre de neurones à GnRH dans l'hypothalamus rendent leur étude délicate. Celle-ci a été facilitée par la création d'une lignée immortalisée de neurones à GnRH (GT1) obtenue par oncogénèse ciblée, en intégrant dans le génome murin l'antigène T du virus SV40 (Simian virus 40) placé sous contrôle du promoteur du gène de la GnRH de rat (Mellon *et al.*, 1990). A l'image des neurones hypothalamiques en culture, les neurones GT1 sécrètent la GnRH de façon pulsatile et synchronisée, suggérant l'existence d'un générateur de pulses endogène associé à une synchronisation de la population neuronale (pour revue : Weiner *et al.*, 1992). Ces neurones expriment à la fois les récepteurs aux œstrogènes (Roy *et al.*, 1999) et aux androgènes (Belsham *et al.*, 1998, Poletti *et al.*, 2001), et sont ainsi capables d'intégrer une régulation directe par les stéroïdes. Ces données sont en accord avec les effets de ces hormones sur la régulation de l'expression du gène de la GnRH *in vitro* (Radovick *et al.*, 1991, Belsham *et al.*, 1998, Roy *et al.*, 1999). Cependant, les stéroïdes sexuels pourraient également réguler la sécrétion de GnRH en agissant sur d'autres neurones eux-mêmes impliqués dans la régulation des neurones à GnRH. Des données récentes suggèrent notamment un rôle essentiel des neurones à kisspeptide dans les rétrocontrôles exercés par l'œstradiol sur la sécrétion de GnRH (voir ci-dessous).

Un autre aspect passionnant de la régulation de la sécrétion de GnRH concerne la relation entre reproduction et métabolisme. Très coûteuse en énergie, en particulier chez les femelles, la fonction de reproduction est naturellement bloquée en cas d'insuffisance des réserves énergétiques (pour revue : Martin *et al.*, 2008). Parmi les molécules signalisatrices relayant cette information vers le système nerveux central, la leptine, hormone peptidique produite par le tissu adipeux, pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation des neurones à GnRH. A faible concentration, la leptine stimule la libération de GnRH à partir d'explants hypothalamiques de souris (Yu *et al.*, 1997) mais également *in vivo* par injection intrahypothalamique chez le rat (Watanobe, 2002). L'expression de récepteurs de la leptine n'étant pas clairement établie dans les neurones à GnRH (Finn *et al.*, 1998, Magni *et al.*, 1999), ceux-ci pourraient être régulés indirectement, *via* un ou plusieurs types de neurones afférents eux-mêmes sensibles à cette hormone. Comme dans le cas des stéroïdes sexuels, les neurones à kisspeptide semblent constituer un relai essentiel entre la leptine et les neurones à GnRH (Smith *et al.*, 2006).

#### - Facteurs centraux

Les neurones à GnRH reçoivent de nombreuses afférences nerveuses en provenance de noyaux hypothalamiques ou d'autres régions du cerveau. Une accumulation de données montre que de très nombreux neurotransmetteurs de type monoamines (noradrénaline, dopamine, sérotonine), neuropeptides (opiacés, neuropeptide Y, neurotensine, ocytocine, peptide vasoactif intestinal VIP, substance P, galanine...), acides aminés (GABA, glutamate, aspartate) ou encore le monoxyde d'azote (NO) sont impliqués dans la régulation des neurones à GnRH par voie centrale (Caraty *et al.*, 2001). En 2003, un nouveau système ligand/récepteur intervenant dans cette régulation a été

découvert, le couple Kisspeptides/GPR54 (pour revue : Pineda *et al.*, 2010). Cette découverte, considérée comme la plus importante de ces dix dernières années dans le domaine de la neuroendocrinologie de la reproduction, a suscité un très vif intérêt auprès de nombreux groupes de recherche, conduisant notamment à réinterpréter certains résultats obtenus antérieurement. Les acteurs de ce système ont d'abord été identifiés indépendamment entre 1996 et 2001. Le gène *Kiss1*, codant pour un précurseur commun aux kisspeptides, a été initialement identifié par une approche d'hybridation différentielle soustractive qui comparait les transcriptomes de cellules normales et métastatiques (Lee JH *et al.*, 1996). Ce gène s'est avéré réprimé dans les cellules de mélanome métastatiques. Un autre groupe a par ailleurs isolé par clonage un récepteur à 7 domaines transmembranaires orphelin, nommé GPR54, sur la base de son homologie de séquence avec les récepteurs de la galanine (Lee *et al.*, 1999). Les kisspeptides, formant une famille de peptides de différentes tailles issues d'un précurseur commun par maturation protéolytique, n'ont été identifiés qu'en 2001. La forme de 54 acides aminés, majoritaire chez l'homme, est capable de supprimer l'invasion de cellules tumorales et a initialement été nommée métastine (Ohtaki *et al.*, 2001). Les kisspeptides ont par la suite été identifiés comme les ligands de GPR54 (Kotani *et al.*, 2001). En 2003, de façon inattendue, deux études ont mis en évidence des mutations invalidantes de *GPR54* chez des patients atteints d'HH idiopathique normosmique (c'est-à-dire non associé à une anosmie, typique du syndrome de Kallmann) ou HHIn (de Roux *et al.*, 2003, Seminara *et al.*, 2003). Des modèles de souris invalidées pour *Gpr54* puis pour *Kiss1* ont permis de confirmer le rôle essentiel joué par ce système dans le contrôle neuroendocrine de la reproduction. Par la suite, des neurones à kisspeptide ont été localisés dans l'hypothalamus, en particulier dans les noyaux arqué et antéro-ventral périventriculaire (AVPV) chez les Rongeurs. Contrairement aux neurones du noyau arqué, les neurones de l'AVPV contacteraient directement les neurones à GnRH (Clarkson et Herbison, 2006), et seraient impliqués dans le contrôle positif exercé par les œstrogènes sur la sécrétion de GnRH (Smith *et al.*, 2005). Les neurones à kisspeptide du noyau arqué joueraient quant à eux un rôle majeur dans le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol (Smith *et al.*, 2005). Ils semblent également impliqués dans la mise en place de la puberté, retardée ou absente chez les patients porteurs d'une mutation de *GPR54* (de Roux *et al.*, 2003, Seminara *et al.*, 2003). En outre, le transcrit du récepteur de la leptine a pu être colocalisé avec l'ARNm de *Kiss1* chez la souris, suggérant que les neurones à kisspeptide pourraient relayer l'action de la leptine sur la sécrétion de GnRH (Smith *et al.*, 2006). Les kisspeptides possèdent un motif C-terminal de type RF-amide (Arginine-Phénylalanine amidée), indispensable à l'interaction avec leur récepteur. Récemment, un nouveau peptide à motif RF-amide été isolé à partir du cerveau de caille (Tsutsui *et al.*, 2000), la Gonadotropin-Inhibitory Hormone (GnIH), capable d'inhiber de façon spécifique la sécrétion des gonadotropines sur des cultures d'hypophyses (pour revue : Tsutsui *et al.*, 2010). Des peptides de type RFRP (RFamide Related Peptides) ont par la suite été identifiés chez les Mammifères, parmi lesquels le peptide RFRP-3, est considéré comme l'homologue de la GnIH. Des données récentes suggèrent un rôle inhibiteur direct de RFRP-3 sur l'activité électrique des neurones à GnRH chez la souris (Ducret *et al.*, 2009), mais également sur la synthèse et la libération des gonadotropines induite par la GnRH *in vitro* dans des cultures d'hypophyse de rat et de mouton (Murakami *et al.*, 2008, Sari *et al.*, 2009). Ces observations, associées à la présence de terminaisons

à peptide RFRP au niveau de l'éminence médiane et de l'expression de son récepteur (GPR147) dans les cellules gonadotropes chez l'homme (Ubuka *et al.*, 2009), laissent supposer que RFRP-3 constitue une neurohormone hypophysiotrope inhibitrice de la fonction gonadotrope chez les Mammifères.

#### - *Facteurs locaux*

Dans l'éminence médiane, les cellules gliales exercent un contrôle local sur la libération de la GnRH dans les capillaires du système porte (pour revue : Ojeda *et al.*, 2008). Les terminaisons nerveuses à GnRH y côtoient principalement deux types de cellules gliales, les astrocytes et des tanycytes. Les tanycytes sont des cellules épendymaires bordant le plancher du troisième ventricule et possédant des prolongements radiaires qui parcourent le tissu nerveux adjacent. Les modulations locales de la sécrétion de GnRH auraient deux origines principales. D'une part, les cellules gliales agissent sur les neurones à GnRH *via* des molécules signalisatrices membranaires ou solubles, parmi lesquelles des facteurs de croissance comme l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) jouent un rôle majeur en stimulant la sécrétion de GnRH (Hiney *et al.*, 1991). D'autre part, l'éminence médiane présente une plasticité morphologique, grâce à des réarrangements dynamiques des contacts entre les cellules gliales, les neurones à GnRH et l'endothélium vasculaire : ceci facilite plus ou moins l'accès de la GnRH aux capillaires. De plus, les stéroïdes sexuels, en particulier l'œstradiol, modulent ces réarrangements plastiques. Dans des conditions basales d'œstradiol (par exemple chez des rattees en dioestrus II), les prolongements des tanycytes forment des canalicules guidant les axones à GnRH en direction des capillaires sanguins, mais présentent des renflements terminaux qui interdisent le contact direct entre les terminaisons nerveuses à GnRH et l'espace perivasculaire (Kozlowski et Coates, 1985). Chez les rattees en proestrus, ayant un taux sérique d'œstradiol élevé, des contacts directs entre neurones à GnRH et endothélium apparaissent, mettant en jeu la formation de prolongements neuronaux et d'évaginations endothéliales, associées à la rétractation des renflements des tanycytes (Prevot *et al.*, 1999). Ces réarrangements favoriseraient ainsi le pic de GnRH induisant la décharge préovulatoire de LH.

### **1.1.2. Le RGnRH hypophysaire**

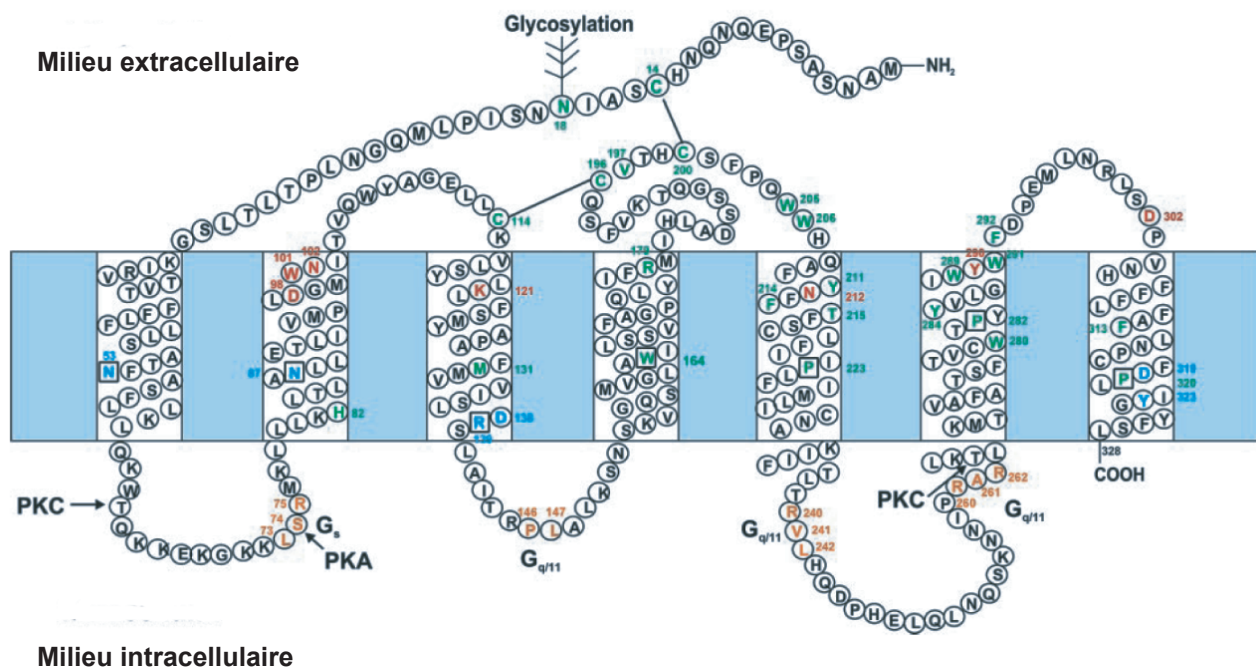
#### **a. Découverte et structure du RGnRH**

Si les neurohormones hypophysiotropes ont été longues et complexes à caractériser, leurs récepteurs l'ont été encore davantage. Associés à des systèmes de transduction très performants et hautement amplificateurs, ils sont présents en nombre restreint à la membrane plasmique. En outre, ils ne sont exprimés que par un seul type cellulaire dispersé au sein du tissu hétérogène que constitue l'hypophyse antérieure. Avant même d'en connaître la séquence, l'appartenance du RGnRH à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) avait été établie grâce à l'étude des effets intracellulaires induits lors de son activation (Andrews *et al.*, 1986). Dans les années 90, l'isolement de l'ADN complémentaire (ADNc) du RGnRH dans plusieurs espèces de Mammifères a permis d'élucider sa structure protéique. Cet ADNc a d'abord été isolé et identifié chez la souris, à partir d'une banque d'ARNm issue de la lignée gonadotrope murine  $\alpha$ T3-1

(Tsutsumi *et al.*, 1992). Cette séquence a été confirmée (Reinhart *et al.*, 1992) et a grandement facilité la caractérisation par clonage du récepteur chez d'autres espèces, en particulier chez le rat (Eidne *et al.*, 1992, Kaiser *et al.*, 1992, Perrin *et al.*, 1993) et les espèces humaine (Kakar *et al.*, 1992, Chi *et al.*, 1993), ovine (Brooks *et al.*, 1993, Illing *et al.*, 1993), bovine (Kakar *et al.*, 1993) et porcine (Weesner et Matteri, 1994). Les séquences protéiques déduites des différents ADNc partagent plus de 80% d'homologie. Celle-ci est maximale dans les hélices transmembranaires. Le RGnRH contient 327 acides aminés chez le rat et la souris, 328 chez l'homme du fait d'une lysine supplémentaire en position 191 (**Figure 5**). En outre, les récepteurs de Rongeurs possèdent deux sites potentiels de glycosylation dans leur domaine N-terminal extracellulaire, alors que le récepteur humain n'en possède qu'un seul (Davidson *et al.*, 1995). Ce nombre de sites ne modifie ni la spécificité, ni l'affinité de la liaison du ligand sur le récepteur, mais influe sur le nombre de récepteurs recrutés à la membrane, qui diminue quand ces sites sont supprimés (Davidson *et al.*, 1996). La structure tridimensionnelle du récepteur est également stabilisée par deux ponts disulfure, formés entre les deux premières boucles extracellulaires ainsi qu'entre la seconde boucle et le domaine N-terminal. Vues du milieu extracellulaire, les 7 hélices forment une poche hydrophile où la proximité des hélices 1, 2 et 7 a été démontrée par l'analyse de mutants (pour revue : Millar *et al.*, 2004), et confirmée par analogie avec la structure tridimensionnelle de la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000). La fixation de la GnRH induit un changement de conformation du récepteur, conduisant à l'activation de protéines G trimériques qui constituent le point de départ de cascades de signalisation intracellulaires. Plusieurs résidus essentiels à la fixation du ligand, à la transduction du signal, à l'interaction du récepteur avec les protéines G ou constituant des cibles pour l'action de protéines kinases ont été mis en évidence par l'analyse de mutants et sont résumés sur la **Figure 5** (pour revue : Millar *et al.*, 2004). Par ailleurs, le RGnRH a également été cloné chez de nombreuses espèces non mammaliennes au sein des Chordés (voir § 1.2.1 ; pour revue : Millar *et al.*, 2004, Kah *et al.*, 2007). Ces formes orthologues possèdent 58 à 67% d'homologie entre elles, mais seulement 42 à 47% d'homologie avec les formes mammaliennes, du fait de l'absence de queue C-terminale intracellulaire chez ces dernières.

#### **b. Modèles d'étude du RGnRH : les lignées $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2**

Comme nous l'avons souligné plus haut, la caractérisation du RGnRH s'est révélée possible grâce à l'établissement préalable de lignées gonadotropes murines. Ces lignées constituent en outre des modèles essentiels pour l'étude des propriétés et des mécanismes d'activation du *Rgnrh*. La lignée  $\alpha$ T3-1 fut la première établie par P. Mellon, selon un protocole d'oncogenèse dirigée chez la souris. Selon la même démarche que celle suivie pour l'établissement des lignées neuronales GT1 (Mellon *et al.*, 1990), plusieurs lignées de souris transgéniques ont été créées par injection d'une construction comportant la séquence codante de l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur humain de l' $\alpha$ GSU (Windle *et al.*, 1990). Des adénomes hypophysaires se sont ainsi développés chez ces souris et ont été prélevés pour être mis en culture afin de caractériser et de sélectionner différents clones cellulaires. Parmi eux, les cellules clonales  $\alpha$ T3-1 expriment trois des marqueurs de différenciation terminale du lignage gonadotrope, les gènes codant l' $\alpha$ GSU, le RGnRH



**Figure 5 :**  
**Structure du récepteur de la GnRH humain**

Le RGNRH hypophysaire mammalien est le seul récepteur de la famille des GPCR à être dépourvu de queue C-terminale intracellulaire classiquement impliquée dans le processus de désensibilisation homologue par internalisation. Chez l'homme, le RGNRH ne contient qu'un seul site de glycosylation. La structure tertiaire du récepteur est également stabilisée par deux ponts disulfure extra-cellulaires. L'étude de récepteurs mutants a permis d'identifier des acides aminés impliqués dans la formation de la poche de liaison (en vert), la liaison du ligand (en rouge), l'activation du récepteur (en bleu) et le couplage aux protéines G (en orange). Les sites potentiels de phosphorylation par la PKA et la PKC sont également indiqués (d'après Millar *et al.*, 2004).

et le facteur stéroïdogénique SF1 (NR5A1). En revanche, elles n'expriment ni les gènes codant pour la LH $\beta$  et la FSH $\beta$ , ni aucun des gènes codant pour les autres hormones anté-hypophysaires. Dans ces cellules, la transcription du gène codant la sous-unité  $\alpha$  est induite de façon dépendante de la dose et spécifiquement par la GnRH. En effet, la TRH, qui cible classiquement les cellules thyroïdées, n'est pas capable de stimuler la transcription de ce gène. Les cellules  $\alpha$ T3-1 présentent donc bien les caractéristiques propres aux cellules gonadotropes et non aux cellules thyroïdées, qui expriment également l' $\alpha$ GSU, sous-unité commune à la LH, la FSH et la TSH. Par la suite, l'équipe de P. Mellon a caractérisé les RGnRH exprimés par ces cellules et analysé leur signalisation intracellulaire (Horn *et al.*, 1991). Ces études ont révélé une bonne corrélation entre les caractéristiques du récepteur exprimé par ces cellules et celles du récepteur natif hypophysaire, notamment sa densité d'expression à la membrane et ses propriétés de liaison. La lignée  $\alpha$ T3-1 a ainsi été validée comme modèle d'étude du RGnRH, avec néanmoins l'inconvénient majeur de ne pas produire d'hormones gonadotropes. Ces cellules représentent très vraisemblablement un stade de différenciation immature du lignage gonadotrope, au moins équivalent au jour de développement embryonnaire (E)13,5/E14,5, date à laquelle s'exprime SF1 (Ingraham *et al.*, 1994), mais plus précoce que E16,5, date à laquelle débute l'expression du gène de la LH $\beta$ , suivie de la FSH $\beta$  à E17,5 (Japón *et al.*, 1994).

Par la suite, la même équipe a créé la lignée cellulaire L $\beta$ T2, suivant le même protocole, mais en utilisant cette fois le promoteur du gène de la LH $\beta$  de rat (Thomas *et al.*, 1996). Comme les cellules  $\alpha$ T3-1, la lignée L $\beta$ T2 exprime les gènes de l' $\alpha$ GSU, du RGnRH et de SF1 mais également le gène codant la LH $\beta$ . En outre, ces cellules sont capables de sécréter la LH en réponse à la GnRH, qui stimule également les niveaux des transcrits du *Rgnrh* et du gène de la LH $\beta$  (Turgeon *et al.*, 1996). On a d'abord pensé que ces cellules n'exprimaient la FSH que sous traitement par l'activine (Graham *et al.*, 1999), avant que ne soit mise en évidence une expression basale très faible de cette hormone (Pernasetti *et al.*, 2001). De plus, ces cellules sont capables d'accumuler les gonadotropines dans des grains de sécrétion, à l'image des cellules gonadotropes naturelles. Elles représentent ainsi un stade plus différencié du lignage gonadotrope comparées aux cellules  $\alpha$ T3-1. Enfin, il est important de mentionner dans le cadre de cette étude que, comme les cellules  $\alpha$ T3-1, les cellules L $\beta$ T2 expriment un ensemble de facteurs de transcription, dont le facteur stéroïdogénique SF1, essentiels à l'expression des gènes marqueurs du lignage gonadotrope. Ainsi les cellules L $\beta$ T2 expriment les cinq gènes marqueurs du lignage gonadotrope mature, c'est à dire les gènes codant SF1, le RGnRH, l' $\alpha$ GSU, la LH $\beta$  et la FSH $\beta$ .

### **c. Signalisation, désensibilisation et effets associées au RGnRH mammalien dans l'hypophyse**

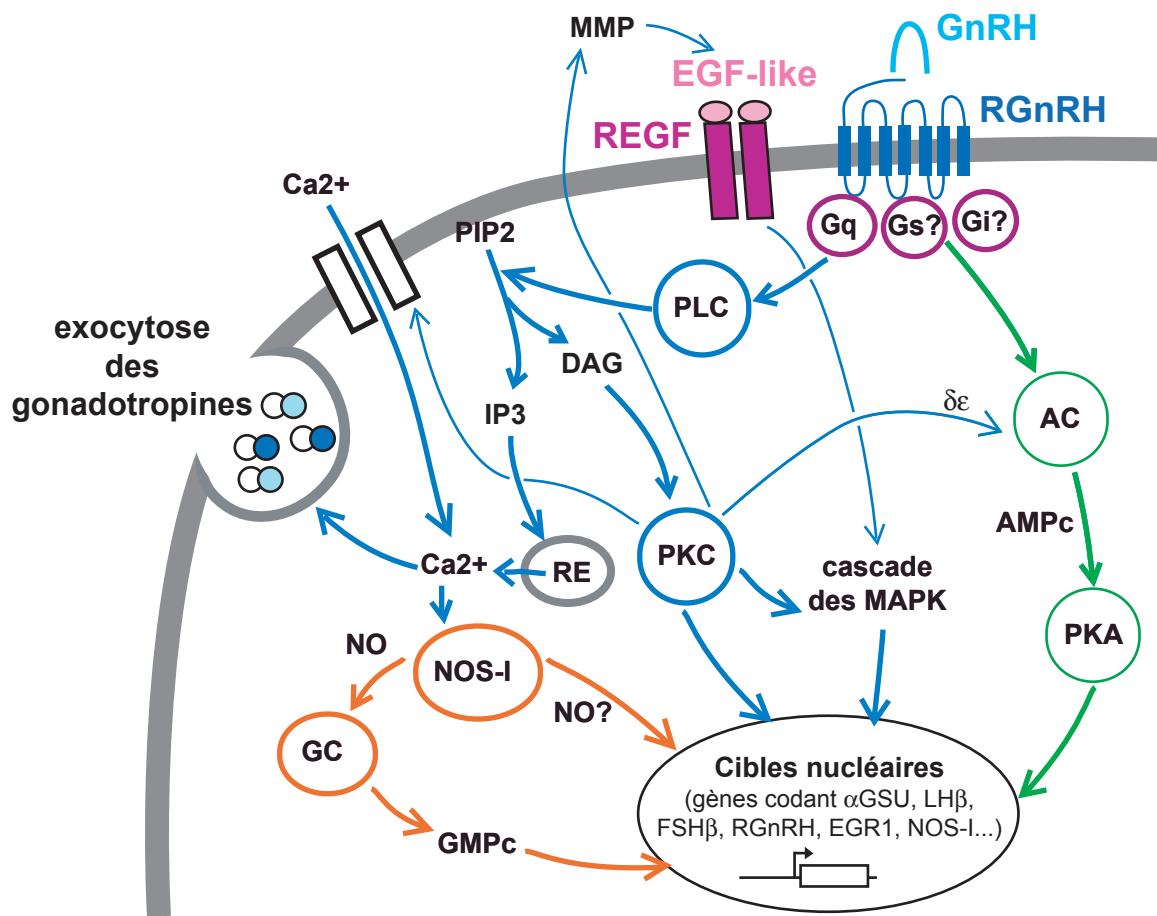
La description détaillée et exhaustive des voies de signalisation associées au RGnRH se révélerait fastidieuse et peu pertinente dans le cadre de cette étude. Aussi, cette présentation sera volontairement restreinte aux mécanismes essentiels induits par l'activation du RGnRH ainsi qu'aux



facettes les plus originales de cette signalisation. L'un des aspects les plus intéressants concerne la relation étroite existant entre les caractéristiques du signal GnRH (fréquence/durée/amplitude) et les effets biologiques qu'il induit (pour revue : Counis *et al.*, 2009).

Dans les lignées gonadotropes  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2 ainsi que dans des cellules hypophysaires de rat, le RGnRH semble majoritairement couplé aux protéines Gq/G<sub>11</sub> (Hsieh et Martin, 1992, Grosse *et al.*, 2000a). Leur activation conduit à la stimulation de la phospholipase C $\beta$  qui catalyse la transformation de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacyl glycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>), induisant respectivement l'activation de plusieurs isoformes de la protéine kinase C (PKC) et la mobilisation de calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire. Ce dernier évènement, associé à l'entrée massive de calcium extracellulaire par des canaux voltage-dépendants, est principalement impliqué dans la libération des gonadotropines (pour revue : Naor, 2009). La GnRH induit également l'activation de la cascade des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) *via* la PKC (Sundaresan *et al.*, 1996), conduisant à la stimulation de la transcription des gènes codant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des gonadotropines (pour revue : Naor *et al.*, 2000). Il a également été proposé que le RGnRH active les MAPK de type ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) *via* la transactivation du REGF (Récepteur de l'Epidermal Growth Factor) dans les lignées  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2 (Grosse *et al.*, 2000b, Roelle *et al.*, 2003), mais ce dialogue RGnRH/REGF fait l'objet de controverses (Bonfil *et al.*, 2004, Benard *et al.*, 2001). L'activation du REGF s'effectuerait par l'intermédiaire de facteurs de croissance apparentés à l'EFG (EGF-like) libérés par des métalloprotéases dans la matrice extracellulaire. L'élévation du calcium intracellulaire provoque, outre la libération de LH et de FSH par exocytose, l'activation de la NO synthase neuronale (NOS-I) qui conduit à une production de monoxyde d'azote (NO) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Ceccatelli *et al.*, 1993, Lozach *et al.*, 1998). La GnRH induit également une accumulation lente et progressive d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), dont le mécanisme, longtemps controversé, a été partiellement élucidé au laboratoire. Dans les cellules L $\beta$ T2, ce mécanisme impliquerait à la fois l'activation des isoformes de PKC « nouvelles »  $\delta$  et  $\epsilon$  (Lariviere *et al.*, 2007) et le couplage du récepteur à la protéine Gs (Liu *et al.*, 2002). D'autres données suggèrent un couplage du RGnRH à la protéine Gi (Hawes *et al.*, 1993). Les principaux éléments de ce réseau de signalisation sont représentés sur la **figure 6**. Outre l'exocytose des gonadotropines, l'activation du RGnRH entraîne des effets transcriptionnels qui touchent les gènes codant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des gonadotropines mais également ceux codant des éléments de sa propre signalisation incluant le RGnRH (Lerrant *et al.*, 1995), la NOS-I (Garrel *et al.*, 1998), des isoformes des sous-unités des protéines kinases PKA (Garrel *et al.*, 1995) et PKC (Harris *et al.*, 1997) ou des facteurs de transcription comme EGR1 (Wolfe et Call, 1999). Une étude réalisée sur puces à ADN suggère que la GnRH régule l'expression de plus de 200 gènes dans les cellules L $\beta$ T2 (Kakar *et al.*, 2003). Tous ces éléments participent conjointement à un mode de régulation subtil de la synthèse et de la libération des gonadotropines.

La caractérisation par clonage en bactérie du RGnRH de Mammifère a permis de décrypter sa structure primaire et de confirmer son appartenance à la famille des GPCR. Il a également révélé une particularité étonnante de ce récepteur, qui est le seul de cette famille à ne pas posséder de queue



**Figure 6 :**  
**Les multiples voies de signalisation associées au RnRH**  
**dans la cellule gonadotrope**

L'activation du RnRH active de multiples voies de signalisation intracellulaires interconnectées. Tous ces éléments participent conjointement à un mode de régulation subtil de la synthèse et de la libération des gonadotropines.

La voie principale (en bleu) débute par le couplage du récepteur à la protéine Gq/G11, activant la PLC qui clive le PIP2 en DAG et IP3. Ces seconds messagers induisent respectivement une activation de la PKC et la libération de calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique (RE). La voie des MAP Kinases est activée directement ou via la transactivation du récepteur à l'EGF (REGF) par des facteurs EGF-like libérés dans la matrice extracellulaire par des métalloprotéases (MMP). Des canaux calciques voltage-dépendants participent également à l'augmentation de la concentration intracytosolique de calcium, qui provoque l'exocytose rapide des gonadotropines.

Le calcium induit également l'activation de la NOS-I (en orange), aboutissant à la production de GMPc par activation d'une guanylate cyclase (GC) via le monoxyde d'azote (NO).

Une production d'AMPc a également été mise en évidence (en vert). L'activation de l'adénylate cyclase (AC) est provoquée par des isoformes nouvelles de la PKC ( $\delta\epsilon$ ) mais pourrait également découler du couplage du RnRH avec la protéine Gs. D'autre part, un couplage à la protéine Gi a également été suggéré.

C-terminale. Or, cette extension intracellulaire est la cible de phosphorylations qui permettent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, déclenchant le processus d'internalisation des complexes ligand/récepteur dans les vésicules recouvertes de clathrine (Lefkowitz, 1998). Ce mécanisme classique est mis en jeu lors de stimulations intenses ou prolongées du récepteur par son ligand, et induit une désensibilisation homologue rapide de la cellule. Exprimé artificiellement dans des cellules COS-1, le RGNRH humain n'est quasiment pas internalisé suite à une stimulation massive par la GnRH, contrairement à un RGNRH non mammalien (de poulet) équipé d'une queue C-terminale, et dont l'internalisation est ralentie après délétion de cette région (Pawson *et al.*, 1998). En outre, l'activation massive du RGNRH humain n'entraîne pas la translocation membranaire classique d'une protéine de fusion  $\beta$ -arrestine-GFP (Green Fluorescent Protein) cotransfectée avec le récepteur dans les cellules COS-1 (McArdle *et al.*, 2002). La chute drastique de la sécrétion des gonadotropines observée suite à une stimulation massive par la GnRH (Belchetz *et al.*, 1978), mise en jeu dans les castrations chimiques (voir § 1.1. 1.c), ne s'explique donc pas par les mécanismes classiques auxquels sont soumis les autres GPCR. En raison de sa structure originale, la désensibilisation du RGNRH mammalien serait majoritairement sous-tendue par des mécanismes post-récepteur, différenciellement activées en fonction des fréquences et durées de stimulation par la GnRH (Counis *et al.*, 2009).

Il est en effet bien établi que les variations de fréquence dans la libération de la GnRH ont une influence sur la sécrétion des gonadotropines, en particulier au cours du cycle ovarien. Le pic de LH pré-ovulatoire provoqué par une décharge massive de GnRH en constitue probablement la meilleure illustration (Xia *et al.*, 1992). On sait maintenant que le rythme de sécrétion de la GnRH influe directement sur la synthèse des sous-unités des hormones gonadotropes ainsi que sur certains acteurs de la signalisation du RGNRH. Plus précisément, une fréquence lente (par exemple un pic toutes les 4 heures *in vivo* chez le rat) favorise la transcription du gène de la FSH $\beta$  tandis que des fréquences plus élevées (un pulse toutes les 30 minutes) induisent préférentiellement la transcription des gènes codant la LH $\beta$  et l' $\alpha$ GSU (Dalkin *et al.*, 1989, Burger *et al.*, 2002), ainsi qu'une augmentation du nombre de RGNRH (Katt *et al.*, 1985). En revanche, si la stimulation est maintenue dans le temps, elle aboutit à une diminution du taux d'ARNm des sous-unités  $\beta$  (Lalloz *et al.*, 1988, Rodin *et al.*, 1988) ainsi que du récepteur (Lerrant *et al.*, 1995), contrairement à l' $\alpha$ GSU qui s'accumule lentement pendant plusieurs jours, et dont la quantité augmente dans le sang des patients traités par injections chroniques et massives d'agonistes de la GnRH (Lahlou *et al.*, 1987). Au laboratoire, la NOS-I a également été identifiée comme réfractaire à la désensibilisation affectant les sous-unités  $\beta$  et le récepteur (Garrel *et al.*, 1998). Des données récentes ont éclairci les mécanismes subtils à l'origine de la désensibilisation de la LH $\beta$ . Parmi les facteurs de transcription stimulant l'expression du gène codant cette sous-unité, le facteur EGR1, lui-même activé par la signalisation post-récepteur (Duan *et al.*, 2002, Tremblay et Drouin, 1999, Wolfe et Call, 1999), joue un rôle essentiel dans ce processus. En effet, la stimulation de l'expression du gène de la LH $\beta$  par la GnRH est induite par une augmentation rapide de l'expression d'EGR1, qui s'accompagne d'une augmentation plus lente de deux répresseurs d'EGR1, NAB1 et NAB2 (Lawson *et al.*, 2007). En outre, le promoteur du gène *Nab2* contient des éléments de réponse pour EGR1 qui, en stimulant l'expression de son propre répresseur, amplifie la répression de l'expression de la LH $\beta$  (Kumbrink *et*

*al.*, 2005). Des mécanismes assez similaires impliquant l'activation séquentielle de facteurs sécrétés antagonistes, l'activine et la follistatine, induiraient la désensibilisation de la FSH $\beta$  (Besecke *et al.*, 1996). Concernant les voies de signalisation impliquées, la voie AMPc/PKA serait préférentiellement activée par des décharges massives de GnRH, et de façon différée dans le temps comparé aux voies principales PKC/MAPK, activées rapidement (Larivière *et al.*, 2007 ; pour revue : Naor, 2009). Si le système EGR1/NAB2 paraît activé par toutes ces voies (Duan *et al.*, 2002, Horton et Halvorson, 2004), l'expression de la follistatine serait induite plus spécifiquement par la voie AMPc/PKA (Winters *et al.*, 2007). Par des mécanismes encore largement inconnus, le RGnRH est ainsi capable de traduire les fréquences et les durées de stimulation en effets intracellulaires adaptés.

Des études récentes ont reconsidéré la question de l'internalisation des RGnRH mammaliens, internalisation déjà suggérée il y a 30 ans par la mise en évidence de l'entrée d'un agoniste fluorescent de la GnRH dans des cellules hypophysaires de rat en culture (Hazum *et al.*, 1980). Le marquage de ces récepteurs a longtemps été exclusivement réalisé par liaison d'un agoniste marqué, ne permettant pas de visualiser le RGnRH sans l'activer simultanément. Récemment, une étude a démontré que les RGnRH mammaliens (humain, rat, souris) s'internalisent dans une proportion très faible et de façon constitutive dans les lignées COS-7 et HEK 293. Ce phénomène a pu être mis en évidence grâce à l'insertion d'une étiquette (tag) moléculaire dans la séquence du RGnRH, servant d'épitope pour suivre sa localisation par immunofluorescence (Pawson *et al.*, 2008). Par la même approche, une internalisation dépendante d'une stimulation par un agoniste a été mise en évidence dans la lignée HeLa concernant le RGnRH de souris, ainsi que le récepteur humain si son expression est préalablement stabilisée à la membrane (Finch *et al.*, 2009). En effet, la présence d'un acide aminé supplémentaire dans le RGnRH humain, la lysine en position 191, induirait une diminution de son recrutement membranaire comparé aux récepteurs de Rongeurs, qui sont eux-mêmes moins exprimés que les formes non mammaliennes à queue C-terminale (Conn *et al.*, 2002). Historiquement, les premiers effets biologiques observés des neuropeptides hypothalamiques comme la GnRH concernaient la libération des hormones hypophysaires. Par la suite, les effets génomiques sur la transcription des gènes codant ces hormones ont également été mis en évidence, suggérant des actions directes de ces facteurs hypothalamiques au niveau nucléaire. La recherche de récepteurs nucléaires ou l'induction d'effets biologiques sur noyaux isolés n'ont pas été couronnées de succès et ont été progressivement abandonnées. On sait aujourd'hui que les cascades de signalisation intracellulaires permettent la transduction des signaux en provenance de la membrane plasmique jusqu'au noyau (**Figure 6**). Néanmoins récemment, une étude a mis en évidence une expression majoritairement nucléaire du RGnRH humain exprimé artificiellement dans les lignées HEK 293 et HTR-8/SVneo (Re *et al.*, 2010). En outre, la présence du RGnRH dans la membrane nucléaire des cellules HEK 293 serait couplée à un nouvel effet biologique, comme suggéré par des modifications de l'histone H3 observées après traitement des noyaux isolés par la GnRH. En tout état de cause, ces données demandent à être confirmées sur d'autres modèles que des lignées non gonadotropes, et seront délicates à valider sur le récepteur endogène en l'absence d'anticorps efficace.

### 1.1.3. Mutations de la GnRH mammalienne et de son récepteur

Des altérations de la GnRH ou de son récepteur chez l'homme et la souris permettent de témoigner du rôle crucial que joue ce couple dans la fonction de reproduction. Des mutations dans leurs gènes ont été recherchées chez des patients atteints d'HHIn. Les formes sévères se traduisent par un impubérisme prononcé, un taux bas ou apulsatile des gonadotropines et des niveaux circulants de stéroïdes sexuels fortement abaissés, induisant une infertilité dans les deux sexes.

#### a. Mutations du gène de la GnRH

Déjà évoquée précédemment (voir § 1.1.1.a), la lignée murine hpg, trop ancienne pour avoir été créée par manipulation génétique (Cattanach *et al.*, 1977), porte une délétion naturelle dans le gène de la GnRH, affectant la région codant le peptide GAP (Mason *et al.*, 1986). Cette mutation n'affecte pas la transcription du gène mais abolit la traduction, induisant un phénotype d'HH sévère, à l'origine de l'infertilité des souris adultes homozygotes pour l'allèle muté. Alors que le gène de la GnRH semble être un candidat idéal pour la recherche de mutations chez les patients atteints d'HHIn, qui sont majoritairement sensibles à un traitement par la GnRH, des mutations du gène de la GnRH associées à ce syndrome n'ont été décrites que très récemment par deux équipes indépendantes (Bouligand *et al.*, 2009, Chan *et al.*, 2009). Dans ces deux études, une atteinte homozygote du gène est associée à un phénotype d'HH sévère. Des cas de mutations hétérozygotes sont également rapportés dans l'une des deux études (Chan *et al.*, 2009) et sont associés à des phénotypes de gravité variable, qui pourraient s'expliquer par l'effet dominant-négatif de l'allèle muté ou encore par l'atteinte simultanée d'autres gènes impliqués dans la fonction de reproduction.

#### b. Mutations du gène du RGnRH

Si les mutations humaines du gène de la GnRH semblent assez rares, on connaît en revanche davantage de mutations touchant le *Rgnrh* chez des patients atteints d'HHIn. Le premier cas rapporté concerne un frère et une sœur hétérozygotes composites, ayant hérité de deux mutations ponctuelles « faux-sens » différentes au locus du *RGnRH* (de Roux *et al.*, 1997). En 10 ans, 21 mutations ont été décrites (Bédécarrats et Kaiser, 2007), pour la plupart de type « faux-sens ». Ces mutations induisent une perte de fonction partielle ou totale du récepteur et souvent retrouvées à l'état hétérozygote composite (pour revue : Karges *et al.*, 2003). Le phénotype associé à ces mutations varie de la déficience hypogonadotrope partielle à un HH sévère. Des travaux récents réalisés dans le laboratoire de P.M. Conn ont permis de reconsidérer les effets de certaines mutations « faux-sens », initialement attribués à une altération de la liaison du ligand ou de la transduction du signal (pour revue : Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004). Sur une large majorité de RGnRH mutés transfectés dans la lignée COS-7, un traitement préalable par une chaperonne pharmacologique restaure la capacité du récepteur à lier un agoniste radiomarqué ainsi que celle d'induire la production d'IP3 (Leaños-Miranda *et al.*, 2002). Ces chaperonnes pharmacologiques sont des analogues de la GnRH capables d'entrer

dans la cellule, qui favoriseraient le repliement correct du récepteur et stabiliseraient son expression membranaire. Ces données suggèrent que les mutations affectant ces récepteurs ont pour effet principal de déstabiliser leur structure tertiaire, induisant une perte de fonction apparente (liaison et/ou signalisation) liée à un déficit du récepteur à la membrane. En outre, ces formes mutées exercent un effet dominant-négatif quand elles sont coexprimées avec le récepteur sauvage *in vitro*, qui pourrait s'expliquer par la formation d'hétérodimères mal repliés entre la forme sauvage et la forme mutée, retenant le récepteur sauvage à l'intérieur de la cellule (Leaños-Miranda *et al.*, 2003). Ces travaux ouvrent des perspectives thérapeutiques nouvelles pour traiter les patients porteurs de ces formes mutées (Conn *et al.*, 2002).

Démontrer la fonction d'un gène nécessite généralement la création d'un modèle transgénique où ce gène est invalidé de façon ciblée. Une lignée de souris (souris ENU) portant une mutation ponctuelle « faux-sens » dans le *Rgnrh* induite par un agent mutagène (l'ENU ou N-Ethyl-N-nitrosurée) a été créée lors d'un programme sans rapport avec la fonction de reproduction (Pask *et al.*, 2005). Ces souris présentent un HH assez sévère conduisant à une stérilité dans les deux sexes, associée à un faible taux de gonadotropines circulantes. Elles semblent cependant moins affectées que les souris hpg, chez lesquelles les gonadotropines circulantes sont indétectables (Cattanach *et al.*, 1977), suggérant une fonction résiduelle du RGnRH dans la lignée ENU. Très récemment, un modèle murin totalement invalidé pour le *Rgnrh* a été créé par la technique de Gene-trap (Wu *et al.*, 2010). Le génome de ces souris a intégré un vecteur dans le premier intron du *Rgnrh*, permettant simultanément d'abolir la fonction du gène et d'étudier son expression grâce à l'introduction du gène rapporteur *LacZ* (codant la  $\beta$ -galactosidase). Comme chez les souris hpg, les gonadotropines sont totalement absentes, avec une abolition complète de la fonction de reproduction chez l'adulte dans les deux sexes. Ce phénotype, plus sévère que celui des souris ENU et des modèles invalidés pour *Kiss1* ou *Gpr54*, a notamment permis de réaffirmer l'importance capitale du système GnRH dans la fonction de reproduction.

## **1.2 Des systèmes GnRH multiples chez les Métazoaires**

### **1.2.1. Les systèmes GnRH chez les Chordés**

La GnRH et son récepteur ont été initialement découverts et caractérisés dans le système hypothalamo-hypophysaire de Mammifères. Dans l'hypophyse, les RGnRH mammaliens connus présentent quelques variations de séquences (voir § 1.1.2.a) mais ont tous en commun l'absence de queue C-terminale (Millar *et al.*, 2004). En revanche, tous les Mammifères étudiés à ce jour possèdent une GnRH hypophysiotrope identique (la mGnRH, décrite § 1.1.1.a), à l'exception de la GnRH de cobaye (gpGnRH pour guinea pig GnRH), différente aux positions 2 et 7 (Jiménez-Liñán *et al.*, 1997). Dès 1982, une nouvelle forme de GnRH capable de stimuler les cellules gonadotropes a été clonée chez le poulet (Miyamoto *et al.*, 1982). Toujours dans cette espèce, une seconde forme de GnRH a été identifiée, la chicken GnRH-II ou cGnRH-II (Miyamoto *et al.*, 1984). Simultanément, une première forme de GnRH originale était découverte chez un poisson Téléostéen, la salmon GnRH ou sGnRH

(Sherwood *et al.*, 1983). Les recherches menées dans différentes espèces se sont succédées et ont conduit à la découverte de nouvelles formes. Actuellement, 24 formes de GnRH ont été identifiées chez les Chordés, toutes de structure décapeptidique, réparties en 9 formes chez les Urochordés (cicones) et 15 formes au sein des Vertébrés, dont 8 séquences originales chez les seuls poissons Téléostéens (Kah *et al.*, 2007, Kavanaugh *et al.*, 2008). Elles partagent toutes une organisation génique identique à celle décrite pour la GnRH mammalienne (**Figure 4**). Comme le poulet, la grande majorité des Vertébrés expriment deux formes de GnRH (pour revue : Kah *et al.*, 2007). Toutes les formes localisées dans le cerveau antérieur et régulant la fonction gonadotrope, dont la GnRH mammalienne, constituent des GnRH de type I. En revanche, la cGnRH-II, hautement conservée chez presque tous les Vertébrés, est principalement exprimée dans le cerveau moyen. La plupart des poissons Téléostéens possèdent une forme de GnRH-I (variable) et la cGnRH-II, parfois accompagnées d'une troisième forme, la sGnRH, qui n'a, jusqu'à aujourd'hui, été décrite que dans ce groupe. Trois formes de GnRH sont ainsi exprimées dans le cerveau du bar européen, où leur localisation suggère une origine commune des neurones à GnRH-I et à GnRH-III (González-Martínez *et al.*, 2004a). Comme pour la GnRH, plusieurs formes de récepteurs ont été mises en évidence chez les Vertébrés depuis l'identification du récepteur mammalien en 1992 (Tsutsumi *et al.*, 1992). Hormis les RGnRH mammaliens hypophysaires, tous possèdent une queue C-terminale permettant leur internalisation rapide et présentent une affinité plus élevée pour la cGnRH-II que pour la GnRH de type I (pour revue : Millar *et al.*, 2004, Kah *et al.*, 2007). A ce titre, ils sont tous considérés comme des récepteurs de type II, contrairement aux RGnRH mammaliens hypophysaires, de type I, préférentiellement activés par la GnRH mammalienne (Flanagan *et al.*, 1994). Jusqu'à cinq RGnRH fonctionnels différents ont pu être identifiés chez certains poissons comme le bar (González-Martínez *et al.*, 2004b).

### 1.2.2. Vers une disparition du système GnRH de type II chez les Mammifères

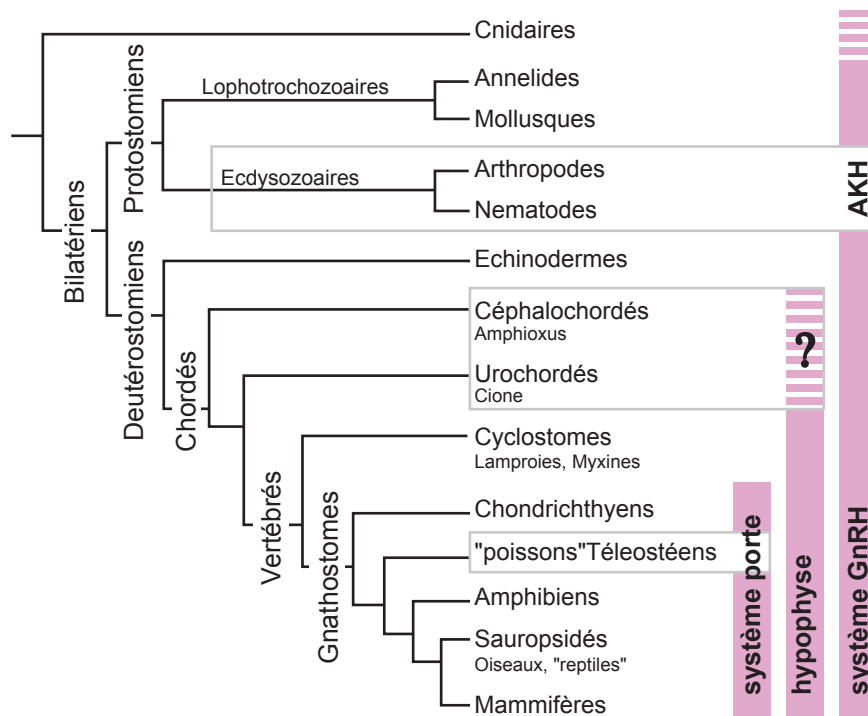
Présent chez une grande majorité de Vertébrés, le système GnRH de type II semble être en train de disparaître chez les Mammifères. Ainsi, la cGnRH-II n'a été mise en évidence que chez trois espèces de Mammifères, la musaraigne musquée (Dellovade *et al.*, 1993), le macaque rhésus (Lescheid *et al.*, 1997) et l'homme (White *et al.*, 1998). En revanche, la cGnRH-II semble avoir été perdue (le gène est absent ou son produit est non fonctionnel) chez le rat, la souris, la vache, la chèvre et le chimpanzé (Morgan *et al.*, 2006). La situation est comparable pour le RGnRH-II dans toutes ces espèces, auxquelles il convient d'ajouter l'homme, dont le gène codant le RGnRH-II contient un codon stop prématuré (Millar *et al.*, 2004), alors qu'il est totalement absent des génomes de rat et de souris. Chez les Mammifères, un RGnRH-II fonctionnel n'a pour l'instant été cloné que chez le ouistiti (Millar *et al.*, 2001), le macaque rhésus et le singe vert (Neill *et al.*, 2001). Une étude récente basée sur la comparaison de séquences d'ADN génomique de 27 espèces de Mammifères suggère la présence d'un ligand de type II potentiellement fonctionnel chez 10 espèces, alors que le gène est inactivé ou absent dans 12 autres espèces sur les 22 séquences disponibles (Stewart *et al.*, 2009). D'autre part, seules 8 espèces sur 22 possèdent un gène codant un récepteur de type II

apparemment fonctionnel. Il est inactivé ou absent chez les 14 autres espèces. Ces résultats, confirmant toutes les études précédentes, suggèrent la présence d'un système GnRH-II potentiellement complet uniquement chez 4 des 18 espèces dont les deux séquences sont connues, le macaque, le ouistiti, une musaraigne et le porc. La forte conservation de ce système chez les Vertébrés non mammaliens laisse toutefois penser qu'il joue des fonctions essentielles, qui pourraient être absentes chez les Mammifères, ou, plus vraisemblablement, être assurées par le système de type I dans ce groupe.

### 1.2.3. Des systèmes GnRH chez les non Vertébrés

Le système GnRH n'est pas exclusivement réservé aux Chordés. Sa présence est clairement établie dans d'autres phylums (**Figure 7**). Ainsi, une immunoréactivité et/ou une activité biologique de type GnRH ont pu être mises en évidence dans de nombreux groupes, au sein des Protostomiens et chez les Cnidaires (pour revue : Kah *et al.*, 2007). Les données les plus abondantes concernent le groupe des Mollusques, où trois peptides homologues à la GnRH ont été caractérisés récemment, chez deux Céphalopodes, le poulpe (Iwakoshi *et al.*, 2002) et le calmar (Onitsuka *et al.*, 2009), ainsi que chez un Gastéropode, l'aplysie (Zhang *et al.*, 2008). Leurs ADNc partagent la même organisation que ceux des Chordés, mais ces trois GnRH contiennent deux acides aminés supplémentaires, constituant donc des dodécapeptides. En outre, un *Rgnrh* a été cloné chez le poulpe (Kanda *et al.*, 2006). Fortement exprimé dans les gonades, sa stimulation induit une augmentation de la synthèse des stéroïdes gonadiques, suggérant un rôle du système GnRH de Mollusque dans la fonction de reproduction. Bien que la conservation du système GnRH chez les Ecdysozoaires soit controversée (Tsai et Zhang, 2008), une étude récente a permis de démontrer que le système AKH (Adipokinetic hormone), apparenté au système GnRH, serait impliqué dans la régulation du processus de ponte chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lindemans *et al.*, 2009). Le lien existant entre le système GnRH et la fonction de reproduction pourrait même s'étendre au-delà des Bilatériens, jusque chez les Cnidaires. En effet, chez le corail *Euphyllia ancora*, la libération massive et synchronisée des gamètes a pu être corrélée avec une augmentation de l'immunoréactivité anti-GnRH, de l'activité aromatasase et de la production de stéroïdes sexuels (Twan *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données suggère une apparition très précoce du système GnRH, incontestablement avant la séparation entre Protostomiens et Deutérostomiens, voire même avant l'émergence des Bilatériens, alors que l'hypophyse n'est présente que chez les Vertébrés (**Figure 7**). Ce constat sous-entend que la GnRH endosserait, à travers les différents groupes de Métazoaires, des fonctions bien plus larges que celles établies dans l'hypophyse. Il pose également la question des mécanismes évolutifs qui gouvernent l'apparition de nouveaux organes exprimant des gènes précédant leur apparition. Ces processus n'étant pas immédiatement accessibles à l'analyse, ils ne peuvent être appréhendés que par l'étude et la comparaison d'espèces actuelles. Dans ce contexte, le décryptage des mécanismes impliqués dans l'expression du *Rgnrh* non seulement dans les cellules gonadotropes mais également dans les sites extra-hypophysaires pourrait contribuer à éclaircir l'histoire évolutive de l'hypophyse et des autres organes concernés.





**Figure 7 :**  
**Répartition du système GnRH chez les Eumétazoaires**

Plusieurs formes de GnRH et/ou de RGNRH ont été clonées chez les Chordés, mais également chez trois mollusques, le poulpe, l'aplysie et le calmar. De plus, la présence d'un système GnRH est suggérée par une immunoréactivité et/ou une activité biologique de type GnRH dans de nombreux groupes de Protostomiens ainsi que chez les Cnidaires. Chez les Ecdysozoaires, le système AKH (Adipokinetic Hormone) pourrait représenter un système homologue au système GnRH.

Le système GnRH serait donc apparu au moins avant la dichotomie Protostomiens/Deuterostomiens, précédant ainsi l'apparition de l'hypophyse.

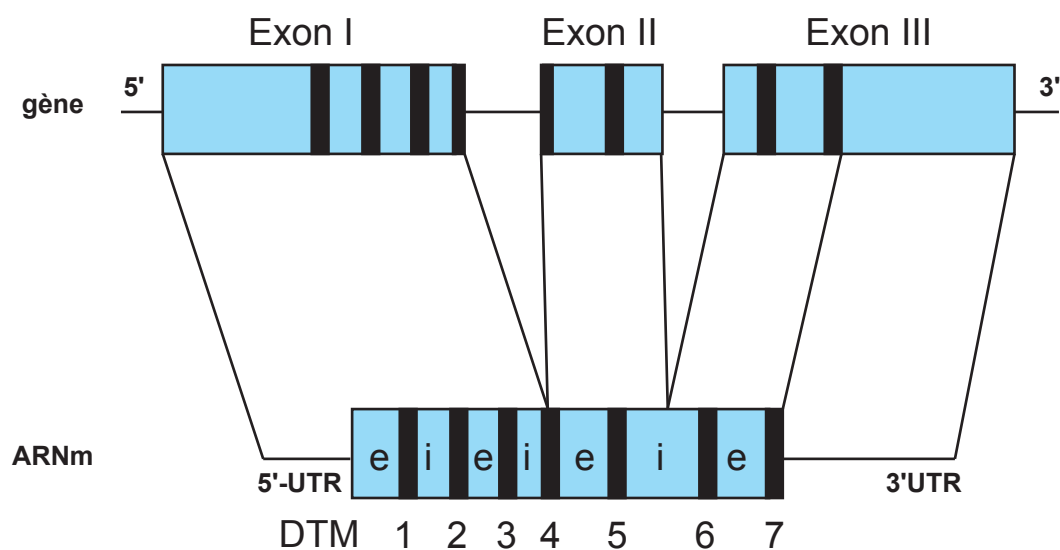
Par souci de simplification et sauf mention contraire, le terme GnRH restera utilisé pour désigner la GnRH de type I. Le terme RGNRH désignera également le RGNRH de type I à l'exception des descriptions d'espèces non mammaliennes, possédant exclusivement des récepteurs de type II.

## 2. Le gène du RGNRH mammalien et sa régulation dans l'hypophyse

La spécificité gonadotrope de la réponse à la GnRH ainsi que son amplitude sont étroitement dépendantes de la présence et du nombre de RGNRH à la surface des cellules cibles. Des variations parallèles du nombre de récepteurs et du niveau d'expression des ARNm sont bien établies au cours du cycle œstrien, suggérant un rôle essentiel de l'étape transcriptionnelle dans la régulation de l'expression du RGNRH. Dans les années 90, l'isolement par clonage des promoteurs du *Rgnrh* chez la souris, l'homme, le rat et le mouton a permis d'initier la description des éléments cis- et facteurs trans-régulateurs impliqués dans leur activité, rendant compte non seulement des mécanismes induisant l'expression constitutive du gène mais également de sa régulation par divers signaux extracellulaires. Les lignées gonadotropes  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2 ont joué un rôle essentiel dans la caractérisation de ces combinatoires transcriptionnelles *in vitro*. Par la suite, l'activité de certains promoteurs a pu être appréhendée *in vivo* par le biais de la transgénèse additionnelle.

### 2.1 Structure du *Rgnrh*

Le *Rgnrh* est localisé sur le chromosome 4 chez l'homme, sur le chromosome 5 chez la souris, sur le chromosome 14 chez le rat, et sur le chromosome 6 chez la brebis (Kaiser *et al.*, 1994, Kottler *et al.*, 1995, Campion *et al.*, 1996). Il est composé de trois exons et deux introns, et s'étend sur 18,9 kb chez l'homme et 22 kb chez la souris (**Figure 8**). L'analyse du génome humain par Southern blot a révélé que ce gène y est présent en une seule copie (Fan *et al.*, 1994). Les deux introns sont localisés dans la phase ouverte de lecture, au niveau des régions codant le quatrième domaine transmembranaire et la troisième boucle intracellulaire. La présence d'introns dans la région codante distingue le *Rgnrh* de nombreux autres GPCR (Fan *et al.*, 1994). Dans l'hypophyse de souris et les cellules  $\alpha$ T3-1, deux transcrits de 1,6 et 3,5 kb ont été détectés par Northern blot (Reinhart *et al.*, 1992). Dans l'hypophyse de rat, un transcrit majoritaire de 4,5 kb a été mis en évidence et certains auteurs ont observé des formes additionnelles de 5,0-5,5 kb, 2,5 et 1,8 kb (Kaiser *et al.*, 1992, Kakar *et al.*, 1994a, Moumni *et al.*, 1994). Quatre transcrits ont également été trouvés chez la brebis (Illing *et al.*, 1993). En accord avec ces données, le transcrit primaire du *Rgnrh* subit des épissages alternatifs



**Figure 8 :**  
**Structure du gène du RGNRH de type I**

Le gène codant le RGNRH mammalien hypophysaire est constitué de 3 exons et 2 introns. La présence de ces derniers dans la séquence codante de son gène, dans les régions codant le quatrième domaine transmembranaire et la troisième boucle intracellulaire, distingue le RGNRH de nombreux autres GPCR.

DTM, domaine transmembranaire, e, domaine extracellulaire, i, domaine intracellulaire.

dans la lignée murine  $\alpha$ T3-1, conduisant à la formation de deux transcrits additionnels codant des peptides de 261 et 177 acides aminés, dépourvus respectivement de l'exon II et de l'exon III, outre le récepteur fonctionnel complet de 327 résidus (Zhou et Sealfon, 1994). Dans l'hypophyse humaine, un variant d'épissage codant pour une protéine tronquée de 249 acides aminés paraît agir comme dominant négatif, inhibant l'adressage membranaire du *Rgnrh* humain complet transfecté dans les cellules COS-7 (Grosse *et al.*, 1997). Au laboratoire, un transcrit délété de l'exon II (220 pb) a été mis en évidence dans l'hypophyse humaine et dans des adénomes hypophysaires (Kottler *et al.*, 1999). Néanmoins, le rôle de ces variants d'épissage reste à établir *in vivo*.

## **2.2 Régulation de l'expression du *Rgnrh* dans l'hypophyse**

### **2.2.1. Variations au cours du cycle œstrien et effets de stéroïdes sexuels**

Des variations du nombre de RGNRH pendant le cycle œstrien ont été observées pour la première fois chez la ratte par liaison d'agoniste radiomarké (Savoy-Moore *et al.*, 1980). Dans l'hypophyse, la densité de sites liant l'agoniste est triplée entre le metestrus et le proestrus, puis chute rapidement après le pic préovulatoire de LH. Par la suite, les variations du nombre de récepteurs ont pu être corrélées avec des fluctuations du niveau d'expression des ARNm, ce niveau étant également maximal le matin du proestrus (Bauer-Dantoin *et al.*, 1993). De même, des variations parallèles de l'expression du RGNRH et de son ARNm ont été observées chez la brebis, atteignant un maximum en fin de phase folliculaire puis diminuant après le pic de LH préovulatoire (Brooks *et al.*, 1993). Ces variations sont également corrélées avec le taux plasmatique d'œstradiol, suggérant l'implication du stéroïde dans la régulation de l'expression du *Rgnrh*. Confortant cette hypothèse, la gonadectomie induit une augmentation du nombre de RGNRH hypophysaires chez le rat mâle ou femelle (Lerrant *et al.*, 1995), alors qu'une administration d'œstradiol, de progestérone ou de testostérone prévient cette augmentation (Clayton et Catt, 1981). Ces expériences, qui mettent en évidence le rétrocontrôle négatif des stéroïdes sexuels sur le contrôle hypothalamo-hypophysaire de la fonction gonadique, ne sont pas démonstratives d'un effet direct des stéroïdes sur les cellules gonadotropes. Ces hormones pourraient agir indirectement *via* leurs effets sur la sécrétion de GnRH hypothalamique (voir § 1.1.1.d). Ainsi, les effets de la castration sont effectivement supprimés par l'administration d'un antagoniste de la GnRH (Kovacs *et al.*, 2001). De même, l'administration de phénobarbital, bloquant la sécrétion de GnRH, empêche l'élévation des ARNm induite par l'œstradiol chez des rattes en proestrus au cours du rétrocontrôle positif précédant le pic de LH (Bauer-Dantoin *et al.*, 1995). L'ensemble de ces observations suggère un rôle essentiel de la GnRH dans la régulation de l'expression de son propre récepteur. Un effet positif direct de l'œstradiol sur le taux d'ARNm du *Rgnrh* a néanmoins pu être observé sur des cultures primaires d'hypophyses de brebis et de ratte (Sealfon *et al.*, 1990, Yasin *et al.*, 1995). Cet effet hypophysaire direct de l'œstradiol est également suggéré par l'étude d'un modèle murin chez lequel le gène codant l'ER $\alpha$  a été invalidé de façon ciblée dans les cellules hypophysaires exprimant l' $\alpha$ GSU (Gieske *et al.*, 2008). Chez les femelles, l'absence de récepteurs ER $\alpha$  dans les cellules gonadotropes se traduit par une absence d'ovulation, corrélée à une incapacité de ces

cellules à engendrer le pic préovulatoire de LH. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'impossibilité, pour les œstrogènes, de stimuler l'expression du *Rgnrh* en phase de préparation de la décharge ovulante.

### **2.2.2. Régulation homologue par la GnRH**

Déjà évoquée au sujet des effets induits par l'activation du RGnRH (voir § 1.1.2.c) et comme suggérée dans le paragraphe précédent, l'implication de la GnRH dans la régulation de son propre récepteur est bien établie dans l'hypophyse. *In vivo* chez le rat, l'expression du récepteur est inhibée par l'administration d'un antagoniste de la GnRH (Kovacs *et al.*, 2001). Les caractéristiques de la stimulation (pulsatilité/fréquence/durée) sont également déterminantes dans les effets induits sur l'expression du récepteur. Ainsi, dans des cultures primaires d'hypophyses de rat, l'administration pulsatile de GnRH (10nM pendant 6 minutes par heure) stimule l'expression des ARNm du récepteur, contrairement à une administration continue (Kaiser *et al.*, 1993). Un intervalle de 30 minutes est optimal pour induire une augmentation du nombre de récepteurs *in vivo* (Katt *et al.*, 1985). Dans les cellules  $\alpha$ T3-1, le maintien d'une stimulation (100 nM) au-delà de 4 heures induit une diminution du niveau des ARNm du *Rgnrh* (Norwitz *et al.*, 1999). Les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle du récepteur par son ligand ont été partiellement élucidés et seront détaillés dans la partie 3.2.3. L'inhibition de l'expression du récepteur par une administration massive et prolongée de GnRH (1 $\mu$ M, 24 heures) dans les cellules  $\alpha$ T3-1 pourrait également mettre en jeu un effet traductionnel, comme le suggèrent les travaux de Tsutsumi et collaborateurs (1995). Suite à ce traitement, le niveau d'expression du *Rgnrh* diminue de 25% sans que le taux d'ARNm soit affecté, mais ces ARN sont 40% moins efficaces que ceux de cellules non traitées pour induire la synthèse d'un récepteur fonctionnel dans des ovocytes de Xénope.

### **2.2.3. Régulation par le couple activine/inhibine**

L'activine et l'inhibine sont deux hormones peptidiques gonadiques qui ont été initialement caractérisées sur leur capacité à réguler la sécrétion de FSH (pour revue : Gregory et Kaiser, 2004). L'activine se compose de deux sous-unités  $\beta$  (A ou B), qui s'associent pour former l'activine A ( $\beta$ A $\beta$ A), l'activine B ( $\beta$ B $\beta$ B) ou l'activine AB hétérodimérique. L'inhibine est constituée par l'association d'une sous-unité  $\alpha$  avec l'une des deux sous-unités  $\beta$ . Elles appartiennent à la famille du TGF (Transforming Growth Factor)  $\beta$  et agissent *via* un récepteur à activité serine-thréonine kinase de type II. L'activine induit une hétérodimérisation du récepteur de type II avec le récepteur de type I, qui, phosphorylé, active à son tour la voie SMAD, aboutissant à l'activation de la transcription de gènes spécifiques. L'inhibine entre en compétition avec l'activine pour se lier au récepteur de type II, mais sans induire les effets de cette dernière. Cette interaction conduit au recrutement d'un co-represseur, le  $\beta$ -glycane, qui à son tour augmente l'affinité de l'inhibine pour le récepteur II, renforçant ainsi le contrôle négatif qu'exerce l'inhibine.

Outre son rôle spécifique sur la sécrétion de FSH, le couple activine/inhibine régule l'expression du RGNRH, induisant ainsi des effets indirects sur la sécrétion des deux gonadotropines. Sur des cellules hypophysaires de ratte en culture, l'activine stimule la synthèse du RGNRH (Braden et Conn, 1992), et induit une augmentation du niveau de ses ARNm dans la lignée murine  $\alpha$ T3-1 (Fernández-Vázquez *et al.*, 1996). A l'inverse, dans des cultures primaires d'hypophyse de rat, l'inhibine diminue le nombre de récepteurs (Wang *et al.*, 1988). Dans ce processus, la synthèse de nouveaux récepteurs ne serait pas affectée (Braden *et al.*, 1990), suggérant un effet post-traductionnel de l'inhibine. En revanche, cette dernière diminuerait la synthèse du RGNRH induite par la GnRH (Braden *et al.*, 1990). Ces régulations semblent cependant spécifiques des Rongeurs, puisque sur des cultures primaires hypophysaires de brebis, l'inhibine induit une augmentation du nombre de récepteurs (Laws *et al.*, 1990) et potentialise la stimulation de la sécrétion de LH induite par la GnRH (Miller et Huang, 1985).

## **2.3 Les approches *in vitro* et le décryptage des combinatoires transcriptionnelles**

Jusqu'à aujourd'hui, les régions 5' non traduites - et supposées régulatrices - ont été isolées et caractérisées chez la souris (Albarracin *et al.*, 1994, Clay *et al.*, 1995), le rat (Reinhart *et al.*, 1997, Pincas *et al.*, 1998), l'homme (Fan *et al.*, 1995, Kakar, 1997) et le mouton (Campion *et al.*, 1996). Le promoteur de rat, étudié au laboratoire, partage plus de 80% d'homologie avec le promoteur de souris sur 1,9 kb mais seulement 55% d'homologie avec le promoteur humain sur 2,2 kb, et 63% d'homologie avec le promoteur ovin sur 900 pb (Pincas *et al.*, 1998). Sur les 900 pb en amont de l'ATG, 42% des nucléotides sont identiques entre les quatre espèces. Le promoteur du *Rgnrh* de souris fait l'objet de nombreux travaux de recherche et partage une homologie élevée avec le promoteur de rat. Très peu de données sont disponibles concernant le promoteur ovin (Campion *et al.*, 1996). Le promoteur humain, beaucoup plus complexe que les promoteurs de Rongeurs (pour revue : Hapgood *et al.*, 2005), sera mentionné ponctuellement pour souligner certaines caractéristiques partagées avec les Rongeurs.

### **2.3.1. Le promoteur de souris**

#### **a. Expression constitutive**

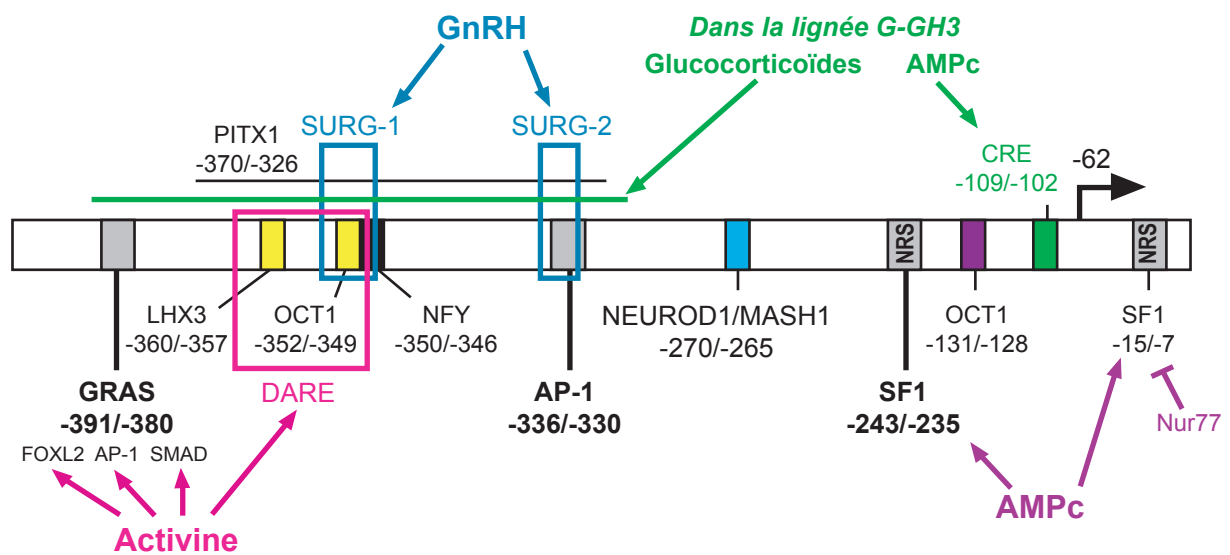
Le promoteur murin de 1,2 kb a été le premier promoteur cloné (Albarracin *et al.*, 1994), suivi d'une version plus étendue de 1,9 kb isolée par une seconde équipe (Clay *et al.*, 1995). Un site majeur d'initiation de la transcription dans les cellules  $\alpha$ T3-1 a été identifié en position -62 (numérotation définie par rapport à l'adénine du codon d'initiation de la traduction considérée à la position +1), ainsi que deux sites additionnels en positions -90 et -200. Le promoteur est dépourvu des boîtes classiques TATA et CAAT à proximité de ces sites d'initiation de la transcription. Dans ces deux

études, la spécificité du promoteur a pu être démontrée par transfection transitoire d'une construction contenant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur murin, induisant une activité maximale dans la lignée gonadotrope  $\alpha$ T3-1, contre une activité relative de 17% dans la lignée somato-lactotrope de rat GH3 et de 5% seulement dans la lignée placentaire humaine JEG-3.

L'activité promotrice spécifique des cellules gonadotropes ( $\alpha$ T3-1) est conférée par une région tripartite située dans les 500 premières bases en amont de l'ATG (**Figure 9**) (Duval *et al.*, 1997a, 1997b). Cette région comporte trois motifs essentiels, l'élément de réponse à SF1 (-243/-235), celui répondant au facteur AP-1 (Activator Protein 1), facteur composé de l'hétérodimère c-FOS/c-JUN (-336/-330), et enfin un nouvel élément dénommé GRAS (GnRH Receptor Activating Sequence) (-391/-380) (Duval *et al.*, 1997b). Dans la lignée  $\alpha$ T3-1, la mutation isolée de chaque élément réduit d'environ 60% l'activité promotrice, activité totalement abolie par la mutation simultanée des trois éléments. Récemment, plusieurs autres motifs ont été caractérisés : un élément de réponse au facteur PITX1 (-370/-326) (Jeong *et al.*, 2004), les éléments de réponse à OCT1 (-352/-349) et à NFY (-350/-346) (Kam *et al.*, 2005) et un élément de réponse au facteur LIM (LIN11-ISL1-MEC3) à homéodomaine LHX3 (-360/-357) (McGillivray *et al.*, 2005). Hormis NFY, tous ces facteurs sont des protéines à homéodomaine, dont le site consensus de liaison sur l'ADN contient un motif crucial TAAT (ou ATTA). Une étude récente a évalué l'importance relative des deux TAAT les plus proximaux du promoteur murin dans les lignées gonadotropes  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2, et a ainsi permis d'identifier un second élément de réponse à OCT1 en position -131/-128 (Lents *et al.*, 2009). Par ailleurs, les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1, formant un hétérodimère connu pour son rôle essentiel dans l'établissement du rythme circadien, pourraient également être impliqués dans la régulation du promoteur dans les cellules  $\alpha$ T3-1 (Resuehr *et al.*, 2007). Les 600 premières paires de bases du promoteur murin contiennent sept éléments de type E-box, constituant des éléments de réponse potentiels pour ces facteurs à domaine hélice-boucle-hélice basique (HBHb). L'un de ces motifs E-box, situé en position -270/-265, est sensible à deux facteurs à domaine HBHb, NEUROD1 et MASH1 (Cherrington *et al.*, 2008). Plus précisément, cet élément est transactivé par NEUROD1 dans les cellules  $\alpha$ T3-1 et par MASH1 dans la lignée L $\beta$ T2 plus différenciée. Ce résultat laisse supposer que ce site pourrait, *in vivo*, être activé de façon séquentielle, d'abord par NEUROD1 puis par MASH1 au cours du développement hypophysaire.

## **b. Expression régulée**

La GnRH joue un rôle majeur dans la régulation du promoteur murin. Deux études ont démontré un effet activateur de la GnRH sur le promoteur dans la lignée  $\alpha$ T3-1 (White *et al.*, 1999, Norwitz *et al.*, 1999), qui implique deux régions promotrices (Norwitz *et al.*, 1999) : SURG-1 (Sequence Underlying Response to GnRH) en position -354/-347, et SURG-2 (-338/-331). Ce dernier contient l'élément AP-1, essentiel à l'activité basale du promoteur (Duval *et al.*, 1997b). SURG-1 recouvre les éléments de réponse pour OCT1 et NFY (Kam *et al.*, 2005). En outre, une approche d'immunoprécipitation de la chromatine a démontré une interaction physique d'OCT1, NFYA et c-JUN



**Figure 9 :**  
**Le promoteur du *Rgnrh* murin (0,5 kb)**

Sur ce schéma sont représentés les différents éléments impliqués dans la régulation de l'activité promotrice du *Rgnrh* de souris. Le promoteur comporte un site principal d'initiation de la transcription localisé en position -62 par rapport à l'adénine du codon d'initiation de la traduction (+1). La plupart des éléments identifiés participent à la fois à l'expression constitutive du *Rgnrh* murin et à sa régulation par la GnRH, l'activine ou l'AMPc.

DARE : Downstream Activin Regulatory Element ; GRAS : GnRH Receptor Activating Sequence ; NRS : Nuclear Response Sequence ; SURG : Sequence Underlying Response to GnRH.



(qui fait partie du complexe AP-1) sur le promoteur dans la lignée murine  $\alpha$ T3-1. Cette interaction s'accroît suite à un traitement des cellules par la GnRH. Des mutations individuelles des éléments de réponse pour ces trois facteurs diminuent à la fois l'activité basale du promoteur et l'effet stimulateur de la GnRH, indiquant que ces mêmes facteurs sont également impliqués dans la régulation homologue de l'expression du récepteur (Kam *et al.*, 2005). L'activation de SURG-2 succède au recrutement de la voie PKC/MAPK par le RGnRH (White *et al.*, 1999, Ellsworth *et al.*, 2003a), sans que la voie AMPc/PKA soit elle-même activée, en accord avec les données sur le couplage exclusif du *Rgnrh* à la protéine Gq/G<sub>11</sub> dans ces cellules (Grosse *et al.*, 2000a). Dans un modèle cellulaire différent, la lignée somato-lactotrope de rat, GH3, transfectée de façon stable par le *Rgnrh* de rat (lignée G-GH3), la GnRH stimule l'activité du promoteur de souris *via* la PKC mais également *via* la voie AMPc/PKA, avec pour cible ultime l'élément CRE (cAMP Response Element) en position -109/-102 (Lin et Conn, 1998, Maya-Núñez et Conn, 1999).

L'activine est également capable de stimuler la transcription du *Rgnrh* endogène ainsi que celle d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur murin de 1,2 kb dans les cellules  $\alpha$ T3-1, cellules qui expriment les récepteurs de l'activine de type I et II (Fernández-Vázquez *et al.*, 1996). En accord avec ces données, la follistatine exerce un effet inhibiteur sur l'activité promotrice basale et induite par l'activine (Fernández-Vázquez *et al.*, 1996, Duval *et al.*, 1999). Elle agit en se liant aux sous-unités  $\beta$  de l'activine, empêchant la formation de dimères actifs. A l'image des cellules gonadotropes hypophysaires, les cellules  $\alpha$ T3-1 expriment également l'activine B, suggérant un mode d'action autocrine ou paracrine de ce facteur (Fernández-Vázquez *et al.*, 1996). Sur le promoteur, l'un des éléments de réponse à l'activine correspond à l'élément GRAS (Duval *et al.*, 1999). En outre, la GnRH et l'activine agissent en synergie, probablement *via* l'instauration d'un dialogue croisé entre les voies de signalisation de leurs récepteurs (Norwitz *et al.*, 2002). En effet, l'élément GRAS est transactivé par des facteurs SMAD, eux-mêmes activés par la voie de signalisation du récepteur de l'activine (Ellsworth *et al.*, 2003b). GRAS est également transactivé par le facteur à domaine Forkhead FOXL2 ainsi que par le complexe AP-1, activé en réponse à la GnRH (Ellsworth *et al.*, 2003a, 2003b). Plus récemment, une étude comparative entre le promoteur de souris et celui de rat, qui est insensible à l'activine et présente une différence d'une base dans l'élément GRAS, a démontré que cet élément est indispensable mais non suffisant pour conférer la sensibilité à l'activine. Une seconde région impliquée dans cette réponse, nommée DARE (Downstream Activin Regulatory Element) a été localisée en aval de GRAS entre -365 et -348, contenant le motif ATTA reconnu par LHX3 ainsi qu'un second TAAT répondant à OCT1, distants de quatre bases (Cherrington *et al.*, 2005). La mutation de ces deux TAAT abolit la réponse à l'activine du promoteur murin. L'implication de LHX3 dans la réponse médiée par DARE est suggérée par l'effet inhibiteur d'un dominant négatif de LHX3 sur la réponse du promoteur à l'activine (Cherrington *et al.*, 2006). En outre, la distance entre GRAS et DARE semble cruciale pour conférer au promoteur murin une sensibilité maximale à l'activine. Ces deux éléments sont séparés par une vingtaine de bases, ce qui les place en phase à deux tours d'hélice sur l'ADN. En modifiant la distance de 5 ou 15 bases, la réponse du promoteur à l'activine est significativement réduite, contrairement aux modifications de 10 ou 20 bases, suggérant une

interaction fonctionnelle entre les facteurs liés, altérée quand GRAS et DARE se trouvent en opposé sur l'hélice d'ADN.

La régulation du promoteur murin par la voie AMPc été mise en évidence dans les cellules  $\alpha$ T3-1, en activant la voie PKA par la forskoline ou l'AMPc puis en évaluant la quantité d'ARNm du récepteur par Northern blot (Sadie *et al.*, 2003). Cet effet, à la fois activateur et inhibiteur, met en jeu deux sites sensibles, l'élément SF1 déjà connu (-245/-236) et un second élément de réponse aux récepteurs nucléaires ou NRS (Nuclear Response Sequence) en position -15/-7. Ces deux éléments sont capables de lier SF1 et NUR77 *in vitro*. Le facteur NUR77 agirait comme régulateur négatif du promoteur murin *via* l'élément NRS proximal.

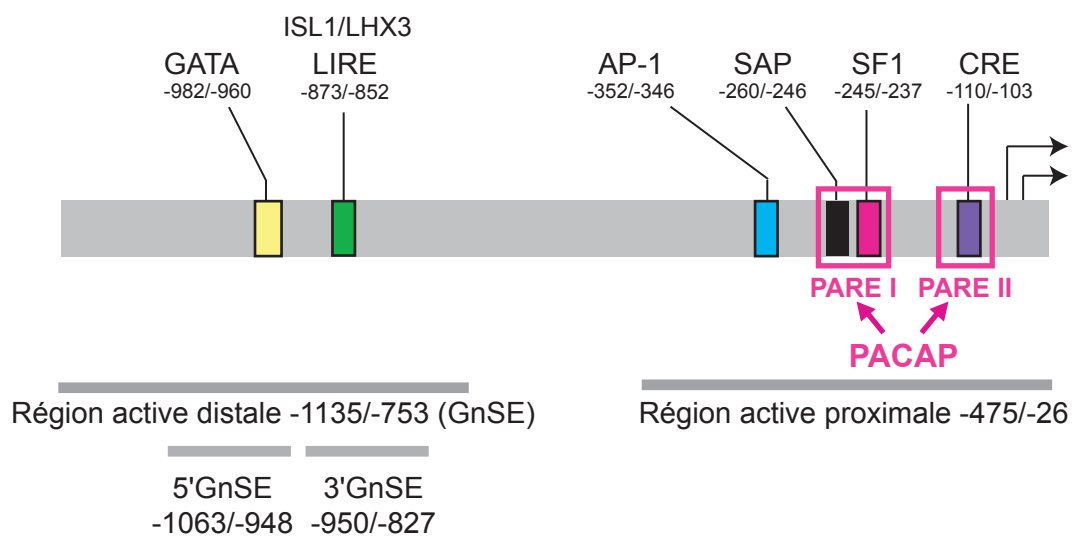
Le promoteur du *Rgnrh* murin serait également sensible aux glucocorticoïdes, comme l'illustre une augmentation du niveau d'ARNm du récepteur suite à un traitement par la dexaméthasone dans les cellules L $\beta$ T2 (Turgeon *et al.*, 1996). Les mécanismes d'action de ces stéroïdes n'ont pas encore été élucidés dans un contexte gonadotrope, mais des études dans la lignée G-GH3 ont mis en évidence un élément de réponse aux glucocorticoïdes dans le promoteur du *Rgnrh* de souris, localisé entre -393 et -317 (Maya-Nuñez et Conn, 2003).

### 2.3.2. Le promoteur de rat

#### a. Expression constitutive

Une région génomique de 3,3 kb située immédiatement en amont du codon d'initiation de la traduction du *Rgnrh* de rat a été isolée au laboratoire par PCR inverse (Pincas *et al.*, 1998). A l'exception de 14 bases, la séquence est identique à celle clonée par Reinhart et collaborateurs (1997). Cinq sites principaux d'initiation de la transcription ont pu être identifiés dans les 110 pb les plus proximales. Cette région s'est révélée capable de diriger l'expression d'un gène rapporteur spécifiquement dans les lignées cellulaires murines gonadotropes  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2, démontrant ainsi qu'elle possédait les propriétés d'un promoteur histospécifique. Par la suite, l'analyse du promoteur du *Rgnrh* réalisée avec ces deux lignées cellulaires a permis de montrer que la région de 1,1 kb s'étendant de -1135 à -26 était suffisante pour obtenir une expression histospécifique maximale (Pincas *et al.*, 1998). Plus précisément, l'activité de cette séquence se répartit à la fois sur les parties proximale (-475/-26) et distale (-1135/-753) du promoteur, cette dernière constituant un enhancer spécifique nommé GnSE (pour GnRH receptor Specific Enhancer) (**Figure 10**). Certaines données montrent que le GnSE n'est actif qu'en présence de la partie proximale, suggérant l'existence d'une interdépendance fonctionnelle entre ces deux régions, bien qu'aucune interaction physique claire n'ait pu être démontrée à ce jour.

Quatre séquences cis-régulatrices ont déjà été identifiées dans la région proximale du promoteur de rat (**Figure 10**) : l'élément CRE liant un facteur de la famille CREB (-110/-103), l'élément SF1 (-245/-237), un élément directement adjacent au motif SF1 et liant un facteur non encore identifié appelé SAP (pour SF1 Adjacent Protein) et enfin le site AP-1 (-352/-346) (Pincas *et al.*, 1998, 2001a).



**Figure 10 :**  
**Le promoteur du *Rgnrh* de rat (1,1 kb)**

Contrairement au promoteur murin, la région proximale du promoteur de rat (0,5 kb) n'est pas suffisante pour induire une expression maximale d'un gène rapporteur dans des cellules gonadotropes. Ce promoteur contient une seconde région active distale, le GnSE (GnRH receptor Specific Enhancer), contenant un élément de réponse aux protéines LIM à homéodomaine (LIRE) ainsi qu'un élément liant un facteur de type GATA. Plusieurs éléments intervenant dans l'expression constitutive du *Rgnrh* de rat sont indiqués sur ce schéma, ainsi que les deux régions PARE (PACAP Response Element) I et II impliquées dans la régulation par le PACAP. Il existe plusieurs sites d'initiation de la transcription situés à -97, -99, -107 et -110.

La présence de l'élément SF1 sur les promoteurs de rat et de souris, mais également sur le promoteur humain (Ngan *et al.*, 1999), reflète l'importance de ce facteur dans la régulation spécifiquement gonadotrope du *Rgnrh* mammalien.

En parallèle, les éléments de réponse situés dans l'enhancer distal ont été partiellement identifiés au laboratoire. Deux domaines indépendants et agissant de manière additive, nommés 5'GnSE (-1063/-948) et 3'GnSE (-950/-827) confèrent une activité maximale à l'enhancer (Pincas *et al.*, 2001a). L'analyse de la région 5'GnSE par retard sur gel (ou EMSA : Electromobility Shift Assay) a permis de mettre en évidence une interaction avec une protéine apparentée aux facteurs GATA (Pincas *et al.*, 2001a). En outre, un élément de réponse aux protéines LIM à homéodomaine a été caractérisé par de multiples approches au sein du 3'GnSE (Granger *et al.*, 2006). L'élément de réponse caractérisé dans le promoteur du *Rgnrh* de rat, appelé LIRE (-873/-852), pour LIM Response Element, lie spécifiquement les protéines ISL1 et LHX3, qui interagissent sous forme d'hétérodimère. D'autres facteurs de la même famille, comme LHX9 et LHX5, sont notablement moins efficaces. De plus, SF1 stimule l'activité du promoteur de 1,1 kb en synergie avec ces deux protéines (Granger *et al.*, 2006), suggérant que ces trois facteurs, au moins, forment une combinatoire transcriptionnelle activant le promoteur de façon extrêmement spécifique. Les promoteurs de rat et de souris contiennent un élément de réponse bien conservé pour LHX3. Il est intéressant de noter que cet élément LIRE, caractérisé dans l'enhancer distal chez le rat, est situé dans la région proximale du promoteur de souris et en sens inverse par rapport au rat. Il a donc conservé une fonction similaire chez ces deux espèces malgré une position différente et inversée. Enfin, il est important de souligner ici que le promoteur humain répond également à LHX3 et ISL1 (Granger *et al.*, 2006).

## **b. Expression régulée**

Le PACAP (Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Peptide) est un polypeptide de 38 acides aminés qui, comme l'indique son nom, a été initialement isolé à partir d'extraits hypothalamiques ovins pour ses propriétés d'activation de l'adénylate cyclase dans des cellules anté-hypophysaires de rat en culture (Miyata *et al.*, 1989). Par la suite, de nombreux effets du PACAP ont été décrits à la fois dans le système nerveux central et en périphérie, en particulier dans l'hypophyse et les glandes surrénales (Counis *et al.*, 2007, Ghzili *et al.*, 2008). Dans les cellules gonadotropes, le PACAP participe notamment à la régulation du *Rgnrh* de rat. Au laboratoire, cette régulation a été mise en évidence dans les cellules  $\alpha$ T3-1, qui expriment les récepteurs PAC1-R spécifiques du PACAP (Pincas *et al.*, 2001b). Les effets induits par le PACAP sur le promoteur du *Rgnrh* sont similaires à ceux provoqués par la toxine cholérique et sont fortement réduits par un inhibiteur de la PKA, alors que l'activation de la voie PKC n'entraîne aucune variation de l'activité promotrice, démontrant que le PACAP stimule le promoteur du *Rgnrh* via la voie AMPc/PKA. Ces données sont cohérentes avec la stimulation de l'activité du promoteur du *Rgnrh* de rat dépendante de la voie PKA précédemment décrite dans les cellules  $\alpha$ T3-1, en excluant toute intervention de la voie PKC (Reinhart *et al.*, 1997). Les régions promotrices médiant la réponse au PACAP ont pu être délimitées sur deux éléments, PARE I (PACAP

Response Element) (-272/-237), incluant les éléments SF1 et SAP, et PARE II (-136/-101), qui contient un élément de réponse non palindromique à l'AMPc (TGACGTTT). Ces observations confortent l'idée que ce neuropeptide puisse jouer un rôle crucial dans le fonctionnement des cellules gonadotropes, en particulier sur la synthèse et la libération des gonadotropines (Counis *et al.*, 2007).

## **2.4 Les apports réciproques entre régulation d'expression génique et mécanismes du développement hypophysaire**

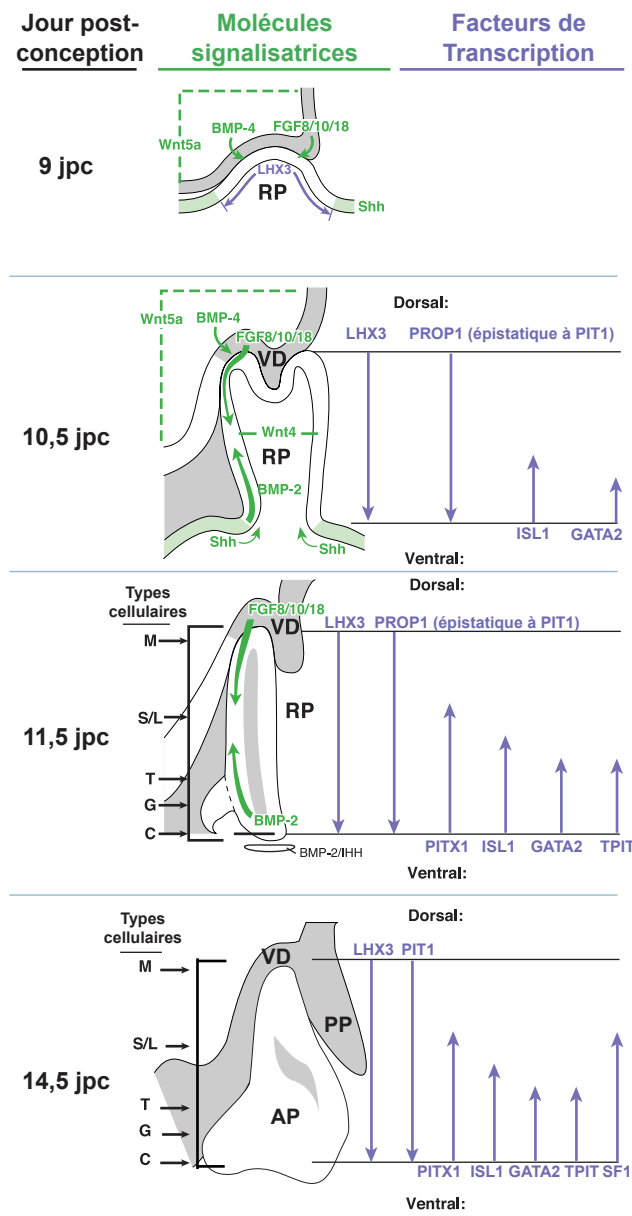
### **2.4.1. L'hypothèse de départ**

La stratégie classique adoptée pour mettre en évidence les facteurs de transcription et leurs éléments de réponse débute généralement par la recherche des régions promotrices les plus actives dans un type cellulaire défini, grâce à diverses constructions artificielles. La séquence de ces régions est ensuite analysée pour y repérer un ou plusieurs motifs consensus constituant des éléments cis-régulateurs putatifs, dont l'activité peut ensuite être évaluée notamment par mutagenèse dirigée. Les facteurs de transcription impliqués dans leur activation sont alors recherchés et caractérisés notamment par EMSA, mettant en évidence les complexes protéiques associés à la séquence d'intérêt, dont la migration peut encore être retardée par un anticorps spécifique (supershift) si celui-ci cible le complexe. Concernant l'étude de l'expression du *Rgnrh*, les travaux réalisés sur le développement hypophysaire pourraient faciliter l'identification de ces facteurs. Au cours des vingt dernières années, ces études, en particulier celles conduites par M.G. Rosenfeld, ont permis d'identifier plusieurs mécanismes qui contribuent à la différenciation des lignages hypophysaires endocrines. Ces recherches se sont développées à partir d'une hypothèse initiale simple : les facteurs impliqués dans l'expression des gènes marqueurs des différents lignages hypophysaires chez l'adulte, seraient également engagés dans la différenciation de ces lignages pendant le développement embryonnaire. Cette hypothèse s'est révélée fructueuse, permettant d'isoler et/ou de caractériser les facteurs POU1F1/PIT1 (lignages lactotrope, somatotrope et thyrotrope) (Ingraham *et al.*, 1988), TBX19/TPIT (lignage corticotrope) (Lamolet *et al.*, 2001), SF1 (lignage gonadotrope) (Barnhart et Mellon, 1994) et plusieurs autres agissant en combinaison ou en amont de ces facteurs. En tant que gène marqueur précoce du lignage gonadotrope (Granger *et al.*, 2004, Wen *et al.*, 2010), le *Rgnrh* pourrait constituer un excellent modèle d'étude pour identifier des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de ces cellules. Inversement, des facteurs de transcription engagés dans la différenciation hypophysaire sont susceptibles de réguler l'activité du promoteur du *Rgnrh*, à l'image des protéines LIM à homéodomaine ISL1 et LHX3, indispensables à l'organogénèse hypophysaire, ou encore de SF1, impliqué dans la différenciation terminale du lignage gonadotrope (Zhu *et al.*, 2007).

#### 2.4.2. Les gradients morphogénétiques et la détermination des lignages anté-hypophysaires

En raison des possibilités étendues de manipulations génétiques *in vivo* chez la souris, les mécanismes régulant l'ontogenèse hypophysaire ont été essentiellement étudiés chez cette espèce. Chez celle-ci, la poche de Rathke succédant à la placode hypophysaire se forme par invagination de l'ectoderme oral à partir de E8,5, puis elle grandit et s'individualise pour former les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse. L'émergence de six types cellulaires endocrines anté-hypophysaires à partir d'un même primordium ectodermique constitue un modèle d'étude privilégié pour aborder les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la différenciation d'un lignage au cours du développement embryonnaire. L'apparition de chaque lignage suit un schéma spatio-temporel bien défini, dont l'étape la plus précoce dépend de facteurs extrinsèques à la poche de Rathke. En effet, des expériences de cocultures d'organes ont démontré que l'apparition de cellules différenciées à partir de poches de Rathke murines précoces (E9,5) n'est possible qu'en présence du diencephale ventral (ou infundibulum), correspondant à la région du futur hypothalamus (Watanabe, 1982, Ericson *et al.*, 1998, Treier *et al.*, 1998). Plus tardivement (vers E12), les cellules de la poche de Rathke sont capables d'achever de façon autonome le programme de différenciation préalablement induit par des signaux extrinsèques (Treier *et al.*, 1998). Plusieurs signaux diffusibles participent à l'induction précoce de la différenciation hypophysaire chez la souris, en provenance du diencephale ventral ainsi que de l'ectoderme oral et du tissu mésenchymal juxta-pituitaire (Ericson *et al.*, 1998, Treier *et al.*, 1998 ; pour revue : Zhu *et al.*, 2007). Les signaux provenant du diencephale ventral incluent des facteurs de type FGF (Fibroblast Growth Factor), Wnt et BMP (Bone Morphogenetic Protein), notamment FGF8 et BMP4, répartis selon un gradient de concentration dorso-ventral dans l'environnement de la poche de Rathke. A l'opposé, l'ectoderme oral exprime Sonic hedgehog (Shh) dès E9, excepté dans la poche de Rathke, ainsi que BMP2 à partir de E10,5, qui se répartit selon un gradient ventro-dorsal.

Dans le primordium anté-hypophysaire, le destin de chaque cellule dépend ainsi de sa position relative par rapport à deux gradients opposés de molécules diffusibles, qui déclenchent des programmes d'expression génique différentiels (**Figure 11**). Certains facteurs de transcription, tels que les facteurs à homéodomaine HESX1, PROP1, SIX3 et PAX6, sont induits de façon transitoire dans l'hypophyse en cours de différenciation. D'autres facteurs, dont l'expression persiste dans le temps, constituent ainsi la mémoire moléculaire des gradients transitoires initiaux (Zhu *et al.*, 2007). Ces gradients induisent une hétérogénéité dorso-ventrale de l'expression de certains facteurs de transcription, aboutissant à une régionalisation de la poche de Rathke. Plusieurs d'entre eux dont LHX3 et PIT1 sont exprimés dorsalement, alors que GATA2 et ISL1 sont exprimés dans la région ventrale de la poche de Rathke. D'autres facteurs comme PITX1 et PITX2 sont répartis dans toute la poche de Rathke dès sa formation (Drouin *et al.*, 1998). A terme, des combinaisons spécifiques de facteurs de transcription induisent l'apparition des six lignages cellulaires différenciés typiques de l'hypophyse adulte. Parmi eux, le lignage gonadotrope se différencie le plus tardivement, dans la



**Figure 11: Développement hypophysaire**

Ce schéma résume différentes étapes du développement de l'hypophyse entre 9 et 14,5 jours post-conception (jpc) chez la souris. A partir de 9 jpc, les gradients morphogénétiques (symbolisés par des flèches vertes) se mettent en place et induisent progressivement, jusqu'à 11,5 jpc, l'expression de différents facteurs de transcription (en bleu) qui s'expriment ensuite de manière autonome pour, à terme, définir les différents lignages hypophysaires. Schéma modifié d'après Scully et Rosenfeld (2002).

AP : Anté-hypophyse ; PP : Post-hypophyse ; RP : Poche de Rathke ; VD : Diencephale Ventral.  
Types cellulaires : M : Mélanotrope ; S/L : Somatotrope/Lactotrope ; T : Thyroïdrotrope ; G : Gonadotrope ; C : Corticotrope.

région ventrale de l'hypophyse, où la LH $\beta$  et de la FSH $\beta$  ne sont exprimées respectivement qu'à partir de E16,5 et E17,5 (Japón *et al.*, 1994).

#### **2.4.3. Premiers pas dans l'identification des facteurs de transcription impliqués dans le développement : découverte de PIT1**

La détermination et la différenciation terminale de chaque lignage s'opèrent en plusieurs étapes *via* une cascade d'activation de facteurs de transcription, d'abord partagés par des cellules aux destinées diverses, puis de plus en plus spécialisés et régulant l'expression des marqueurs de différenciation terminale de chaque type cellulaire. La découverte de PIT1 a constitué un événement déterminant dans la compréhension de ces mécanismes. Ce facteur de transcription à domaine POU (PIT-OCT-UNC), incluant un domaine POU-spécifique et un homéodomaine POU, a été caractérisé initialement comme activateur de la transcription des gènes codant la GH et la PRL (Ingraham *et al.*, 1988, Mangalam *et al.*, 1989). Des mutations « perte de fonction » dans le gène de PIT1 ont par la suite été identifiées dans les lignées de souris naines Snell et Jackson, présentant un déficit combiné en hormones lactotrope, somatotrope et thyrotrope, démontrant un rôle essentiel de PIT1 dans la différenciation de ces trois lignages (Li *et al.*, 1990). En revanche, le gène codant PIT1 est intact chez les souris naines Ames, qui présentent un phénotype comparable aux souris Snell et Jackson, associé à un déficit partiel en hormones gonadotropes. L'identification du gène invalidé dans la lignée Ames, par clonage positionnel, a permis d'ajouter un niveau supplémentaire dans la compréhension des mécanismes régulant la différenciation de ces lignages (Sornson *et al.*, 1996). Ce gène code pour un autre facteur de transcription à homéodomaine, nommé PROP1 pour « Prophet of PIT1 » car il est exprimé dans les mêmes cellules que PIT1 au cours du développement hypophysaire mais de façon plus précoce. En outre, le phénotype provoqué par l'invalidation de *Prop1* a un effet dominant sur tout génotype au locus *Pit1*, démontrant que PROP1 est épistatique à PIT1. Comme TPIT pour les lignages corticotropes et mélanotropes (Lamolet *et al.*, 2001) ou SF1 pour le lignage gonadotrope (Barnhart et Mellon, 1994), PIT1 constitue un facteur de différenciation terminale des lignages somatotrope, lactotrope et thyrotrope. Des mutations dans les gènes codant PIT1 et PROP1 ont également été identifiées chez des patients présentant des déficits combinés en hormones gonadotropes, indiquant que ces facteurs possèdent une fonction hautement conservée chez les Mammifères (pour revue : Reynaud *et al.*, 2004).

#### **2.4.4. Exemples appliqués au *Rgnrh* : Les protéines LIM-HD et SF1**

##### **a. ISL1 et LHX3**

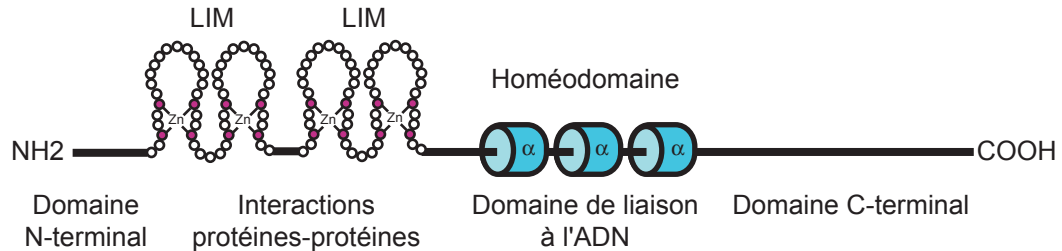
Les protéines LIM-HD constituent une famille de facteurs de transcription possédant un homéodomaine capable d'interagir avec des séquences d'ADN spécifiques comportant un motif



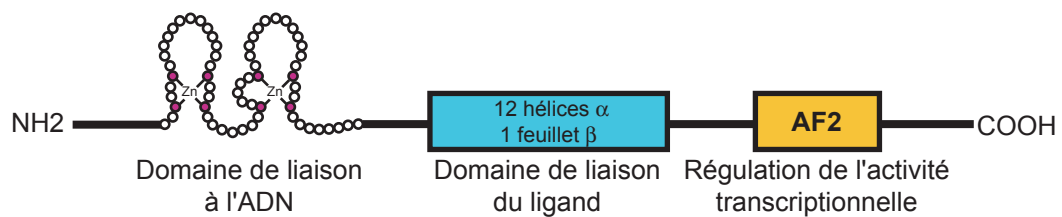
central TAAT, et, en position N-terminale, deux domaines LIM (acronyme composé des trois initiales des protéines modèles de cette famille LIN11, ISL1 et MEC3) (**Figure 12**). L'homéodomaine, codé par une homéoboîte (ou homeobox), est constitué d'environ 60 acides aminés formant trois hélices  $\alpha$ . Deux hélices sont organisées en motif hélice-tour-hélice tandis que la troisième hélice, perpendiculaire aux deux autres, participe directement à la fixation de l'homéodomaine dans le grand sillon de l'ADN. Chaque domaine LIM contient deux doigts de zinc impliqués dans les interactions protéines-protéines. ISL1 (Islet-1) est exprimé dès E8,5 dans l'ectoderme oral, puis à E9,5 dans toute la poche de Rathke, sous l'influence positive de BMP4 puis BMP2. Vers E10,5, son expression est restreinte à la région ventrale sous l'action inhibitrice de FGF8, produit par le diencéphale ventral (Ericson *et al.*, 1998). Egalement exprimé dans le cœur, les motoneurones et les îlots de Langerhans pancréatiques, son invalidation conduit à une léthalité embryonnaire vers E10. Chez ces embryons, l'épithélium de la poche de Rathke est anormalement fin, suggérant un rôle d'ISL1 dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs hypophysaires (Takuma *et al.*, 1998). Le facteur LHX3 (LIM/Homeobox protein 3) est exprimé à partir de E9,5 dans la poche de Rathke, où son expression est maintenue dans les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse adulte. Il est en outre abondamment exprimé au cours du développement dans les motoneurones de la moelle épinière, le rhombencéphale (situé entre le cerveau moyen et la moelle épinière, où se différencient le pont, le cervelet et le bulbe rachidien), la rétine et la glande pinéale. Chez les souris *Lhx3*<sup>-/-</sup>, qui meurent rapidement après la naissance, le développement de la poche de Rathke est interrompu à un stade assez précoce (Sheng *et al.*, 1996). Dans cette structure, l'expression de PIT1 n'est pas induite et seules quelques cellules corticotropes parviennent à se différencier. La fonction de LHX3 semble en grande partie conservée chez l'humain, où des mutations récessives sont associées à des déficits combinés en hormones hypophysaires, incluant celles produites par des lignages dépendants de PIT1 (GH, PRL, TSH) et les hormones gonadotropes (Sloop *et al.*, 2001, Reynaud *et al.*, 2004).

Compte tenu de leurs fonctions essentielles dans les étapes précoces de l'ontogenèse hypophysaire, un rôle éventuel d'ISL1 et LHX3 dans la différenciation terminale et le maintien des lignages hypophysaires ne peut pas être appréhendé par l'étude des modèles murins *Isl1*<sup>-/-</sup> et *Lhx3*<sup>-/-</sup>. Un tel rôle est toutefois fortement suggéré par le maintien de leur expression tout au long du développement hypophysaire et chez l'adulte. Allant dans ce sens, LHX3 régule *in vitro* l'activité promotrice des gènes codant l' $\alpha$ GSU, la PRL, PIT1 et la TSH $\beta$ , en association avec le facteur Paired-like à homéodomaine PITX1 concernant l' $\alpha$ GSU, ou avec PIT1 pour les trois autres facteurs (Bach *et al.*, 1997, Sloop *et al.*, 2001). L'implication de LHX3 dans la régulation de l'activité promotrice du *Rgnrh* murin ainsi que celle de l'hétérodimère ISL1/LHX3 sur le promoteur de rat viennent encore confirmer que les protéines LIM-HD engagées dans l'ontogénèse hypophysaire contrôlent l'expression de marqueurs de différenciation terminale de lignages anté-hypophysaires (McGillivray *et al.*, 2005, Granger *et al.*, 2006).

- Facteurs LIM à Homéodomaine (ISL1, LHX3)



- SF1 (NR5A1)



**Figure 12 :**  
**Structure des protéines LIM à homéodomaine et de SF1**

Les protéines LIM à homéodomaine se fixent à l'ADN par leur homéodomaine, qui comporte 3 hélices  $\alpha$ . Situés dans la région N-terminale, les domaines LIM contiennent chacun deux doigts de zinc riches en cystéines, impliqués dans les interactions protéines-protéines. ISL1 possède également un domaine de reconnaissance de LHX3 (LBD) localisé dans le domaine C-terminal.

Le facteur stéroïdogénique SF1 appartient à la famille des récepteurs nucléaires. La région N-terminale ne comporte pas d'élément AF1 (Activation Function 1) présent chez les autres récepteurs de cette famille. SF1 contient un domaine de liaison à l'ADN constitué par deux doigts de zinc, un domaine de liaison du ligand et un domaine AF2 C-terminal, participant à la régulation de l'activité transcriptionnelle.

## **b. SF1**

Le facteur stéroïdogénique SF1 (officiellement NR5A1) appartient à la famille des récepteurs nucléaires, possédant un motif de liaison à l'ADN à doigts de zinc (**Figure 12**). Longtemps considéré comme orphelin, on sait depuis peu qu'il est capable de lier des sphingolipides (Urs *et al.*, 2006), ainsi que des phospholipides (Krylova *et al.*, 2005). Ces derniers seraient nécessaires pour conférer à SF1 une capacité transactivatrice maximale. Ce facteur est exprimé ventralement dans la poche de Rathke dès E14, mais également dans les gonades, les glandes surrénales et l'hypothalamus ventro-médian. Dans ces sites, il participe à la régulation d'un grand nombre de gènes impliqués dans la détermination et la différenciation du sexe, la stéroïdogénèse et la reproduction. L'invalidation de *Sf1* induit une forte diminution de l'expression des gènes codant la LH $\beta$ , la FSH $\beta$  et le RGnRH (Ingraham *et al.*, 1994, Shinoda *et al.*, 1995). Ces souris présentent de multiples atteintes incluant une agénésie des gonades et une malformation de l'hypothalamus ventro-médian. Afin de vérifier si les effets hypophysaires observés sont causés directement par la perte de SF1 ou sont une conséquence secondaire de l'atteinte gonadique et/ou hypothalamique, un second modèle murin a été créé, dans lequel SF1 a été invalidé de façon ciblée dans l'hypophyse par utilisation du système Cre/LoxP, en floxant le gène *Sf1* et en plaçant la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur de l' $\alpha$ GSU (Zhao *et al.*, 2001). Ce modèle, présentant également un déficit sévère en FSH et en LH, a permis de démontrer un effet direct de la perte de SF1 sur la production d'hormones gonadotropes. Cependant, un traitement des souris *Sf1*<sup>-/-</sup> par une dose supraphysiologique de GnRH stimule la production de LH et de FSH (Ikeda *et al.*, 1995), suggérant que les cellules gonadotropes sont capables d'achever leur différenciation en l'absence de SF1. Bien que cette dernière observation remette en question le rôle incontournable de SF1 dans la différenciation terminale du lignage gonadotrope, ce facteur joue un rôle majeur dans l'expression basale et régulée du *Rgnrh* et des gènes codant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des gonadotropines, et, par là-même, dans le maintien de la fonction gonadotrope chez l'adulte.

## **2.5 Analyse du promoteur du *Rgnrh* in vivo par transgénèse chez la souris**

Les études menées *in vitro* dans les lignées gonadotropes murines ont eu une importance décisive dans l'isolement des régions 5'-régulatrices du *Rgnrh*, ainsi que dans l'identification des éléments cis et trans-régulateurs impliqués dans l'expression basale et régulée du *Rgnrh*. Toutefois, il s'est avéré nécessaire de développer une approche complémentaire *in vivo*, afin de confronter et valider les résultats obtenus *in vitro* mais également de pallier le manque d'anticorps dirigés contre le RGnRH pour étudier son patron d'expression grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs.

### **2.5.1. Modèles créés par transgénèse additionnelle**

La technique de transgénèse additionnelle consiste à injecter un ADN linéaire double brin, le transgène, directement dans un ovocyte fécondé, généralement dans le pronucléus mâle avant qu'il

ne fusionne avec le pronucléus femelle. Dans certains embryons, le transgène est intégré dans le génome hôte, au hasard et souvent en plusieurs copies. Les embryons sont ensuite réimplantés dans une femelle pseudogestante dont la descendance est génotypée. Chaque animal fondateur est sélectionné pour générer une lignée d'animaux se transmettant le transgène de génération en génération.

Cette technique a permis d'initier l'expression de gènes spécifiques *in vivo*. Concernant le *Rgnrh*, des souris transgéniques ont été créées, par intégration d'une construction composée de la séquence codante d'un gène rapporteur ou d'un oncogène placée sous le contrôle d'une région promotrice du *Rgnrh*. Le premier modèle créé comporte le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de 1.9 kb du *Rgnrh* de souris (McCue *et al.*, 1997). Cette construction induit une expression du gène rapporteur spécifiquement dans l'hypophyse, et, dans une moindre mesure, dans le cerveau et les testicules. Cette expression est évaluée par quantification de l'activité luciférase *in toto* dans des lysats d'organes. La même équipe a ensuite créé deux modèles similaires avec un promoteur ovin de 2,7 ou 9,1 kb (Duval *et al.*, 2000). Ces promoteurs induisent également une activité luciférase maximale dans l'hypophyse. De façon surprenante, les mêmes promoteurs ovins ne sont pas actifs dans les lignées gonadotropes  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2, soulignant l'importance des approches *in vivo*. Dans tous ces modèles, des modulations de l'expression du transgène ont été observées suite à un traitement des souris par un sérum anti-GnRH. Les cellules gonadotropes étant les seules à exprimer le *Rgnrh* dans l'hypophyse, ces effets suggèrent indirectement l'expression du transgène dans ce type cellulaire. En outre, un modèle exprimant l'antigène T du virus SV40 sous contrôle du promoteur murin de 1,2 kb induit l'apparition de tumeurs hypophysaires d'origine gonadotrope, en accord avec l'activité cellulaire-spécifique de ce promoteur *in vivo* (Albarracin *et al.*, 1999). Un autre modèle contenant le promoteur murin muté au site AP-1 a permis de confirmer l'implication de cet élément dans la régulation homologue du *Rgnrh* par la GnRH *in vivo*. En revanche, le site AP-1 n'est pas en jeu dans la spécificité de cette expression, qui est correctement détectée uniquement dans l'hypophyse, le cerveau et les gonades (Ellsworth *et al.*, 2003a).

Au laboratoire, un modèle murin (*Rgnrh-hPLAP*) a été créé en plaçant la séquence codante de l'enzyme hPLAP sous le contrôle du promoteur du *Rgnrh* de rat de 3,3 (ou 1,1) kb (Granger *et al.*, 2004). Cette enzyme présente notamment l'avantage d'être détectée *in situ* sur coupes. Dans l'hypophyse adulte, des analyses effectuées par immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre la LH $\beta$ , la FSH $\beta$  et la TSH $\beta$ , ainsi que contre l'ACTH et la GH ont permis de localiser l'expression du transgène dans les cellules gonadotropes à l'exclusion des autres types cellulaires testés, confirmant l'expression spécifiquement gonadotrope de ce promoteur *in vivo*. En outre, le promoteur de 3,3 kb est activé dès E13,5 dans l'hypophyse en développement, constituant ainsi le marqueur le plus précoce du lignage gonadotrope. En outre, des expériences d'immunohistochimie ont permis de colocaliser l'expression du transgène avec l'expression d'ISL1 et LHX3 à E15,5 (Granger *et al.*, 2006). Cette observation suggère que ces facteurs, impliqués dans l'activation du promoteur *in vitro*, jouent également un rôle dans son activation *in vivo*, notamment au cours du développement embryonnaire et de la mise en place du lignage gonadotrope. Outre l'analyse de ces mécanismes moléculaires dans

l'hypophyse, ce modèle permet d'étudier finement les autres sites non hypophysaires d'activité du promoteur, grâce à la grande sensibilité de détection de l'activité de l'hPLAP, mais également à sa haute résolution rendant possible sa localisation sub-cellulaire. Ce modèle palie donc partiellement l'absence d'anticorps fiables dirigés contre le RGNRH.

Il est frappant de remarquer que tous les promoteurs utilisés dans ces modèles permettent d'induire l'expression du transgène spécifiquement dans l'hypophyse de souris, bien qu'ils présentent de nombreuses différences dans les mécanismes régulant leur expression. Ceci suggère que la séquence du promoteur est cruciale dans la sélection des facteurs régulant son expression, mais que la plupart voire tous les facteurs nécessaires à l'expression des différents promoteurs seraient présents dans les cellules gonadotropes de souris.

### **2.5.2. Modèle créé par transgénèse ciblée**

Plus récemment, un modèle murin (*Rosa26-Yfp x Rgnrh-Cre*) exprimant le gène rapporteur codant l'YFP (Yellow Fluorescent Protein) sous contrôle indirect du promoteur du *Rgnrh* endogène a été créé afin de repérer les cellules gonadotropes dans des cultures hypophysaires pour y effectuer des mesures *in vivo* (Wen *et al.*, 2008). En raison de l'absence d'amplification du signal telle que celle fournie par une activité enzymatique, le gène rapporteur *Yfp* n'a pas été placé sous le contrôle direct du promoteur du *Rgnrh*, considéré comme un promoteur faible. Une approche de double Knock-in a été menée, en plaçant d'une part la séquence codante de la recombinaise Cre dans le locus du *Rgnrh*, et d'autre part la séquence *Yfp* dans le locus *Rosa26*, à expression forte constitutive, en ajoutant un élément STOP floxé en amont de la séquence *Yfp*. Ainsi, dans les cellules exprimant le *Rgnrh*, la recombinaise Cre est produite et excise l'élément STOP, conduisant à la production massive d'YFP. Outre l'avantage de découpler les taux d'expression du *Rgnrh* et de l'*Yfp*, cette méthode est basée sur le principe de recombinaison homologue, grâce à laquelle les sites d'insertion sont parfaitement ciblés. Ainsi, une seule copie de chaque transgène est introduite dans le génome. Ce modèle a pu être validé par colocalisation de l'YFP avec les sous-unités LH $\beta$  et/ou FSH $\beta$ . En outre, l'YFP est détectée dès E12,75 dans l'hypophyse en développement, confirmant le résultat obtenu au laboratoire avec le promoteur de rat. Impliquant le locus du *Rgnrh* endogène, cette approche n'apporte aucune information sur la délimitation des régions promotrices régulant son expression. En revanche, elle pourrait *a priori* contribuer à étudier tous les sites d'expression du *Rgnrh* murin, quelles que soient les régions régulatrices impliquées, puisque la recombinaise Cre devrait subir une régulation transcriptionnelle rigoureusement identique à celle du *Rgnrh*.

### 3. Le récepteur de la GnRH hors de l'hypophyse

Le manque d'anticorps capables de reconnaître le RGNRH de façon spécifique et efficace a rendu l'étude du patron d'expression de ce récepteur particulièrement délicate. Ses sites d'expression, d'abord identifiés par liaison de GnRH marquée, par effets biologiques de la GnRH éventuellement bloqués par un antagoniste spécifique, par hybridation *in situ* puis par RT-PCR, ont été réexaminés à la lumière des modèles transgéniques portant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du *Rgnrh*. Les premières études révélant la présence de sites de liaison spécifiques de la GnRH hors de l'hypophyse ont été réalisées très peu de temps après l'identification du neuropeptide, par liaison d'un analogue de la GnRH marqué à l'iode 125 (<sup>125</sup>I-GnRH) sur des fractions membranaires de différents organes (Marshall *et al.*, 1976, Heber *et al.*, 1978). Des sites de liaison spécifiques ont ainsi été mis en évidence dans le foie, la rate, le cortex rénal, les poumons, les testicules, les ovaires, le muscle cardiaque et l'hypothalamus. Par la suite, l'expression du RGNRH a été clairement établie, chez l'homme comme chez d'autres espèces, dans une variété de tissus extra-hypophysaires normaux et tumoraux (pour revue : Hapgood *et al.*, 2005). Au-delà de la question essentielle du rôle joué par le RGNRH dans ces sites, son expression suscite plusieurs interrogations, en particulier celle de la source de GnRH, indétectable dans la circulation générale. En outre, on peut se demander si les mécanismes moléculaires régulant l'expression du récepteur ainsi que ceux induits par la liaison du ligand sont similaires aux mécanismes décrits dans l'hypophyse ou, au contraire, spécifiques de chaque tissu.

#### 3.1 Expression du RGNRH dans les organes reproducteurs

Compte tenu du rôle crucial du système GnRH dans la fonction de reproduction chez les Mammifères, fonction qui est affectée de façon drastique et quasi-exclusive en cas de perte de la GnRH ou de son récepteur (voir § 1.1.3), les gonades constituent un point de départ logique pour l'étude des sites d'expression extra-hypophysaires du RGNRH. L'hypothèse de sa présence dans les gonades de Mammifères, également soutenue par le rôle direct de la GnRH sur la fonction gonadique dans d'autres groupes d'animaux (voir § 1.2.3), a été validée par de nombreuses études. Les premières investigations fonctionnelles ont eu pour objet de vérifier si l'effet « paradoxalement » inhibiteur d'une injection massive et chronique de GnRH sur la fonction de reproduction pouvait impliquer un effet direct sur les gonades. Réalisées *in vitro* sur des cellules en culture ou *in vivo* chez des animaux hypophysectomisés, pour éliminer l'effet hypophysaire de la GnRH, ces expériences ont notamment démontré un effet inhibiteur de la GnRH sur la stéroïdogénèse induite par les gonadotropines chez le rat (pour revue : Hsueh et Jones, 1983).

Dans le cas de l'ovaire, les effets biologiques de la GnRH observés *in vivo* (Hsueh et Erickson, 1979a) ont été reproduits *in vitro* sur des cultures de cellules de la granulosa (Hsueh et Erickson, 1979a) et de cellules lutéales (Clayton *et al.*, 1979), où des sites spécifiques de liaison ont été mis en évidence dans les deux cas (Clayton *et al.*, 1979, Jones *et al.*, 1980). Chez l'homme, des

effets biologiques de la GnRH ont d'abord été observés sur des cellules de la granulosa en culture (Tureck *et al.*, 1982), avant que ne soit mise en évidence pour la première fois l'expression d'un récepteur fonctionnel dans ces cellules, exclusivement dans un follicule préovulatoire dominant, par liaison sur coupe suivie d'autoradiographie (Latouche *et al.*, 1989). Chez la ratte, des approches d'hybridation *in situ* et de RT-PCR quantitative ont permis d'observer une grande variabilité de l'expression du *Rgnrh* en fonction de la phase du cycle œstrien et du stade de maturation folliculaire. Cette expression est en effet détectée dans les follicules de De Graff, mais elle est également particulièrement élevée dans les follicules atrétiques (Bauer-Dantoin et Jameson, 1995, Kogo *et al.*, 1995, Whitelaw *et al.*, 1995). Ces données, associées à l'effet apoptotique de la GnRH sur les cellules de la granulosa de ratte *in vitro* (Billig *et al.*, 1994), suggèrent fortement une implication du RGnRH dans l'atrésie folliculaire. Le système GnRH jouerait également un rôle dans les processus de lutéinisation/lutéolyse en stimulant l'expression de la métalloprotéase MMP-2 (Matrix metalloproteinase 2) dans le corps jaune, enzyme impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Goto *et al.*, 1999). Concernant la source potentielle de ligand dans l'ovaire, plusieurs études ont mis en évidence une expression locale de la GnRH (Oikawa *et al.*, 1990, Clayton *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1993), dont l'ARNm a été localisé dans les cellules de la granulosa et thécales de tous types de follicules (primaire à de De Graff) ainsi que dans le corps jaune chez le rat (Clayton *et al.*, 1992). Cette expression, partiellement corrélée avec celle du RGnRH, suggère un rôle autocrine ou paracrine du système GnRH dans l'ovaire.

Chez le rat mâle, l'inhibition de la stéroïdogénèse par la GnRH observée *in vivo* (Bambino *et al.*, 1980, Hsueh et Erickson, 1979b) a pu être reproduite *in vitro* sur des cellules de Leydig (Hsueh, 1982). Des sites de liaison spécifiques pour la GnRH ont été mis en évidence sur ces cellules (Bourne *et al.*, 1980, Clayton *et al.*, 1980, Lefebvre *et al.*, 1980), contrairement aux cellules de Sertoli dans lesquelles l'ARNm de la GnRH a, quant à lui, été détecté par hybridation *in situ* (Bahk *et al.*, 1995). Ces données suggèrent donc un rôle paracrine de la GnRH dans le testicule de rat. Les effets inhibiteurs de la GnRH sur la stéroïdogénèse induite par la LH observés chez le rat adulte ont également été mis en évidence sur des cellules en culture provenant de testicules néonataux (Dufau *et al.*, 1984) et sur des cultures organotypiques de testicules fœtaux (Habert *et al.*, 1991). Renforçant l'hypothèse d'un rôle du système GnRH au cours de la vie fœtale dans les gonades, les ARNm de la GnRH et de son récepteur ont été mis en évidence au laboratoire, par RT-PCR et dot-blot, dès E14,5 dans le testicule et dès E15,5 dans l'ovaire chez le rat (Botté *et al.*, 1998).

En outre, le transcrit du *Rgnrh* a été détecté par Northern blot dans des cellules germinales de testicule chez le rat et la souris (Bull *et al.*, 2000) et l'activité du promoteur du *Rgnrh* y a été observée chez les souris transgéniques *Rosa26-Yfp x Rgnrh-Cre* (voir § 2.5.2 ; Wen *et al.*, 2010). Ces résultats étant contradictoires avec de nombreuses études ayant mis en évidence une expression restreinte au tissu interstitiel dans le testicule, l'expression du *Rgnrh* dans les cellules germinales mérite de plus amples investigations. Néanmoins, plusieurs observations soutiennent cette possibilité. *In vitro* chez l'homme, l'adjonction de GnRH dans le milieu facilite la fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes (Morales, 1998), où le RGnRH a été détecté par immunohistochimie dans la région

de l'acrosome (Lee *et al.*, 2000). Chez les Rongeurs, des antagonistes de la GnRH inhibent la fécondation *in vitro* et *in vivo* après injection dans l'oviducte (Morales *et al.*, 2002). L'expression de la GnRH a été détectée par RT-PCR et immunohistochimie dans les trompes de Fallope chez la femme (Casañ *et al.*, 2000), suggérant son implication dans les processus de fécondation, de développement précoce du zygote et d'implantation. Allant dans le même sens, des effets stimulateurs de la GnRH ont été observés sur le taux de clivage d'oocytes bovins fécondés *in vitro* (Funston et Seidel, 1995) ainsi que sur le développement préimplantatoire d'embryons de souris (Raga *et al.*, 1999) et de porc (Nam *et al.*, 2005). Dans ces deux dernières études ainsi que chez l'homme (Casañ *et al.*, 1999), l'expression du ligand et de son récepteur ont été détectées dans des embryons préimplantatoires à différents stades. Cependant, aucun rôle crucial du système GnRH n'a pu être mis en évidence au cours des étapes d'implantation et de développement précoce chez les souris invalidées pour le *Rgnrh* (Wu *et al.*, 2010).

Les séquences nucléotidiques des ARNm des récepteurs ovarien et testiculaire ont été établies chez le rat, révélant une séquence identique à celle du récepteur hypophysaire et confirmant l'expression d'un même gène dans ces trois organes (Moumni *et al.*, 1994). L'expression de ce gène pourrait cependant être soumise à des mécanismes régulateurs différents en fonction du site d'expression, voire même dépendre de promoteurs distincts, à l'image du gène mammalien de l'aromatase, *Cyp19*, dont l'expression histospécifique semble impliquer plusieurs promoteurs alternatifs dirigeant l'expression d'une séquence codante unique (Conley et Hinshelwood, 2001). Les modèles transgéniques exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du *Rgnrh* (voir § 2.5.1) peuvent contribuer à répondre à cette question. Des analyses *in toto* chez les modèles exprimant le gène rapporteur de la luciférase ont révélé que le promoteur de souris induit une expression testiculaire faible et variable du transgène, alors qu'aucune expression n'est détectée dans l'ovaire (McCue *et al.*, 1997). Des données similaires ont été obtenues avec les promoteurs ovins, conduisant à une expression de la luciférase significativement plus élevée dans le testicule que dans l'ovaire (Duval *et al.*, 2000). D'après ces résultats, l'expression ovarienne du *Rgnrh* semble régulée par des régions promotrices différentes du promoteur hypophysaire, qui est en revanche capable de diriger l'expression du transgène dans le testicule. De façon plus surprenante, dans le modèle *Rosa26-Yfp x Rgnrh-Cre*, on n'observe aucune expression d'YFP dans l'ovaire alors que, cette fois-ci, c'est le promoteur endogène naturel et complet qui contrôle l'expression des transgènes (Wen *et al.*, 2010).

Outre les gonades, le RGnRH est exprimé dans plusieurs autres tissus associés à la fonction de reproduction. Des sites de liaison de la GnRH ont ainsi été détectés dans le placenta humain (Currie *et al.*, 1981, Belisle *et al.*, 1984). Le transcrit du récepteur y a également été observé par hybridation *in situ* (Lin *et al.*, 1995) ou RT-PCR (Kakar et Jennes, 1995, Boyle *et al.*, 1998, Wolfahrt *et al.*, 1998). Dans ce tissu, cette expression est associée à une production locale de GnRH (Tan et Rousseau, 1982, Wolfahrt *et al.*, 1998). En outre, la GnRH stimule *in vitro* la synthèse et la libération de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (Belisle *et al.*, 1984, Lin *et al.*, 1995). *In vivo*, cette hormone stimule à son tour la sécrétion de progestérone par le corps jaune, nécessaire à



l'établissement et au maintien de la gestation dans les stades précoces. Dans ce contexte, deux études suggèrent une implication du système GnRH dans le remodelage des tissus, particulièrement important au moment de l'implantation. *In vitro* sur cultures primaires de cytotrophoblaste, la GnRH stimule l'expression des metalloprotéases MMP-2 et MMP-9, et diminue celle de TIMP-1 (Tissue-specific Inhibitor of MMP) (Chou *et al.*, 2003a). Dans des cellules déciduales humaines, correspondant à la partie maternelle du placenta issue de l'endomètre utérin, la GnRH stimule *in vitro* l'expression de MMP-2 et MMP-9 sans modifier celle de TIMP-1 (Chou *et al.*, 2003b). En modifiant ainsi la balance MMP/TIMP, le système GnRH pourrait *in vivo* jouer un rôle décisif dans les remodelages tissulaires qui s'effectuent dans les stades précoces de la grossesse. Ces données suggèrent également la présence d'un RGNRH fonctionnel dans la déciduale humaine. Soutenant cette hypothèse, le transcrit du *RGNRH* a été mis en évidence par RT-PCR dans l'endomètre humain (Raga *et al.*, 1998) ainsi que dans le myomètre (Chegini *et al.*, 1996). En outre, le récepteur a été détecté par liaison de <sup>125</sup>I-GnRH dans l'endomètre et le myomètre de rat (Clayton et Catt, 1981). Le transcrit du *RGNRH* a également été mis en évidence dans la prostate et la glande mammaire humaines (Kakar *et al.*, 1992) ainsi que chez le rat (Levi *et al.*, 1996, Tieva *et al.*, 1999). Chez la ratte, les ARNm de la GnRH ont été détectés dans la glande mammaire pendant la gestation et la lactation, suggérant une action autocrine ou paracrine dans cet organe (Palmon *et al.*, 1994). En outre, la présence de GnRH dans le lait est établie depuis longtemps chez la vache et la ratte ainsi que dans l'espèce humaine (Baram *et al.*, 1977). Cependant, il faut préciser qu'une très grande partie des résultats obtenus dans les tissus reproducteurs concernent les formes tumorales qui en dérivent (évoquées § 3.6).

### 3.2 Expression du RGNRH dans les tissus périphériques non reproducteurs

Des interactions entre l'axe HHG et le système immunitaire sont suggérées par des différences liées au sexe dans l'occurrence des maladies auto-immunes, plus fréquentes chez la femme que chez l'homme. Un dimorphisme sexuel a également été observé chez l'animal dans les mécanismes de la réponse immunitaire, qui sont plus forts chez les femelles. Bien que les causes de ces différences demeurent en grande partie non élucidées, les cellules immunitaires semblent être affectées non seulement par les stéroïdes sexuels mais également directement par la GnRH (pour revue : Tanriverdi *et al.*, 2003). Plusieurs études ont démontré une expression du RGNRH par les organes lymphoïdes primaires et les cellules immunitaires circulantes. Ainsi, le RGNRH a été détecté par liaison de <sup>125</sup>I-GnRH dans le thymus et la rate chez le rat (Marchetti *et al.*, 1989, Batticane *et al.*, 1991, Morale *et al.*, 1991), et dans des lymphocytes porcins en culture (Standaert *et al.*, 1992). Chez l'homme, le transcrit du *RGNRH* a été détecté dans plusieurs types de cellules immunitaires (Grasso *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 1999, Silveira *et al.*, 2002). La GnRH semble activer directement certains mécanismes immunitaires, en stimulant notamment l'expression du récepteur de l'interleukine 2 sur des thymocytes et des splénocytes de rat (Batticane *et al.*, 1991), ou encore la production d'interféron-γ par des cellules mononucléaires humaines (Grasso *et al.*, 1998). Des rôles dans le développement du système immunitaire ont également été mis en évidence chez l'animal (Morale *et*

*al.*, 1991). Par ailleurs, des expériences réalisées sur des cellules T normales ou cancéreuses humaines et murines ont démontré des effets de la GnRH sur des molécules impliquées dans l'adhésion, la migration cellulaire, et l'invasion tumorale (Chen *et al.*, 2002). *In vitro*, la GnRH induit notamment l'expression d'un récepteur de la laminine impliqué dans ces processus. En outre, la GnRH serait exprimée par les cellules immunitaires elles-mêmes (Maier *et al.*, 1992, Weesner *et al.*, 1997, Jacobson *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 1999), suggérant la possibilité de régulations autocrines.

Le RGnRH serait également présent dans plusieurs autres tissus périphériques non reproducteurs de Mammifères. Diverses études ont rapporté l'expression du récepteur dans le système digestif chez le rat, au niveau des épithéliums gastrique, de l'intestin grêle, du colon et du rectum ainsi que du plexus myentérique (Huang *et al.*, 2001), dans les glandes sous-maxillaires (Yao *et al.*, 2003) et dans des cultures de cellules musculaires lisses et pariétales de l'estomac (Chen *et al.*, 2004, 2005). Ces études ont mis en évidence le transcrit du *Rgnrh* mais également le récepteur lui-même, par immunomarquage, en utilisant un anticorps anti-idiotypique anti-GnRH. En parallèle, l'expression de la GnRH a été mise en évidence dans le tractus digestif (Huang *et al.*, 2001, Yao *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2005), suggérant une action de type autocrine ou paracrine du système GnRH dans ces sites. La plupart de ces résultats n'ayant pas été reproduits par d'autres groupes ou chez d'autres espèces, la présence étendue du système GnRH dans le tractus digestif mérite de plus amples investigations. Cependant, l'expression du RGnRH avait déjà été évoquée dans le plexus myentérique. Ce plexus, appartenant au système nerveux autonome, est localisé dans la paroi du tube digestif où il participe essentiellement au contrôle de sa motilité. Ainsi, un traitement par un analogue de la GnRH a entraîné une amélioration des symptômes chez des patientes souffrant de pathologies neuromusculaires du tractus digestif (Mathias *et al.*, 1989). Par la suite, l'ARNm du *Rgnrh* a été mis en évidence dans des cultures de neurones myentériques de rats néonataux, suggérant la possibilité d'une action directe des analogues de la GnRH sur les neurones du plexus myentérique (Ho *et al.*, 1996).

Par ailleurs, une étude récente a rapporté des défauts de développement des incisives chez la souris *hpg* déficiente en GnRH, laissant supposer un rôle du système GnRH dans la maturation et la minéralisation des dents. L'expression de la GnRH y a été démontrée, tandis que le transcrit du récepteur a été détecté et sa fonctionnalité suggérée par effets biologiques d'un antagoniste sur des explants dentaires (Tiong *et al.*, 2007).

On peut enfin signaler que le transcrit du *RGnRH* a également été détecté par RT-PCR chez l'homme dans le foie, le muscle squelettique, le cœur et le rein (Kakar et Jennes, 1995), ainsi que dans la glande surrénale chez le rat (Kakar *et al.*, 1994a). Néanmoins, la plupart de ces données demandent à être confirmées et approfondies.

### 3.3 Expression du RGNRH dans le système nerveux central

Depuis plus de 30 ans, plusieurs observations ont suggéré que la GnRH puisse jouer un rôle de neuromodulateur/neurotransmetteur dans le cerveau, rôle qui serait essentiellement lié aux comportements sexuels. Ainsi dès 1973, deux études ont montré qu'une injection sous-cutanée de GnRH facilite le comportement de lordose chez la ratte hypophysectomisée (Moss et McCann, 1973, Pfaff, 1973). Cet effet pourrait, *in vivo*, permettre de synchroniser le comportement sexuel des femelles avec la décharge ovulante de LH. La même observation a été reproduite en injectant la GnRH directement dans la substance grise périaqueducule du mésencéphale, où l'implication de la GnRH endogène a été suggérée par l'effet inhibiteur d'une injection de gammaglobulines anti-GnRH (Sakuma et Pfaff, 1980). Par la suite, des expériences d'hybridation *in situ* et de liaison de  $^{125}$ I-GnRH ont mis en évidence l'expression du RGNRH dans plusieurs sites du cerveau (pour revue : Jennes *et al.*, 1997). Des sites de liaison ont ainsi été détectés chez le rat essentiellement dans le système olfactif, le septum latéral, l'hypothalamus, le noyau interpedonculaire, la substance grise périaqueducule, le colliculus supérieur, le complexe amygdaloïde et l'hippocampe (Badr et Pelletier, 1987, Reubi *et al.*, 1987, Jennes *et al.*, 1988, Leblanc *et al.*, 1988). Les études par hybridation *in situ* ont mis en évidence une distribution du transcrit largement corrélée avec celle de ces sites de liaison (Jennes et Woolums, 1994). Le transcrit du *Rgnrh* a en effet été détecté dans le système olfactif, les noyaux arqué et ventro-médian de l'hypothalamus, l'habénula médiane, l'amygdale et l'hippocampe. Chez les modèles transgéniques exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur murin ou ovin du *Rgnrh*, des analyses *in toto* ont révélé une expression élevée du transgène dans le cerveau, correspondant à 10% du taux d'expression hypophysaire dans le cas du promoteur murin (McCue *et al.*, 1997, Duval *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que le même promoteur est capable de diriger l'expression du transgène à la fois dans l'hypophyse et dans une ou plusieurs régions du cerveau. Chez le modèle transgénique *Rgnrh-hPLAP* créé au laboratoire, le promoteur de rat a également permis d'induire une expression du transgène dans le cerveau. En outre, les sites d'expression ont pu être précisément localisés *in situ* (Granger *et al.*, 2004), recoupant partiellement les données antérieures. En particulier, un marquage intense a été observé dans l'hippocampe, l'amygdale et le septum latéral, ainsi que dans quelques corps cellulaires de l'hypothalamus ventro-médian.

#### 3.3.1. Les neurones à GnRH

Dans l'hypothalamus, les neurones à GnRH suscitent un intérêt particulier en tant que sites potentiels de régulation autocrine par la GnRH. Dans ce contexte, plusieurs études ont suggéré une expression du RGNRH par ces neurones (pour revue : Krsmanovic *et al.*, 2009). Ces mécanismes ont d'abord été étudiés dans une lignée immortalisée de neurones à GnRH murins (GT1-7), dans laquelle l'expression du RGNRH a été mise en évidence par liaison de  $^{125}$ I-GnRH et Northern-blot (Krsmanovic *et al.*, 1993). Ces cultures neuronales, périfusées par un agoniste de la GnRH, répondent par une mobilisation de la signalisation calcique ainsi que des modifications doses-dépendantes de la

sécrétion de GnRH. L'expression du récepteur a par la suite été mise en évidence dans des neurones en culture provenant d'hypothalamus de rat fœtaux, où elle a été colocalisée avec la GnRH par double marquage immunologique (Krsmanovic *et al.*, 1999), ainsi que par microdissection laser des neurones à GnRH suivie de RT-PCR sur cellule unique (Martinez-Fuentes *et al.*, 2004). Les effets d'agonistes de la GnRH ont été observés sur ces cultures (Krsmanovic *et al.*, 1999), mais également sur des neurones dérivés de placodes olfactives de rat, identifiés comme des neurones à GnRH sur des critères morphologiques et exprimant à la fois le transcrit de la GnRH et celui de son récepteur (Martinez-Fuentes *et al.*, 2004). Chez le rat adulte, si l'expression du RGnRH est bien établie dans l'hypothalamus (Jennes *et al.*, 1988, Jennes et Woolums, 1994, Jennes *et al.*, 1997, Krsmanovic *et al.*, 1999), sa localisation dans les neurones à GnRH n'est pas démontrée à ce jour. En revanche, chez la souris adulte, l'expression du *Rgnrh* a été détectée dans une sous-population de neurones à GnRH, en utilisant un modèle de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène de la GnRH. Une approche de RT-PCR sur cellule unique a révélé la présence de l'ARNm du *Rgnrh* dans 52% des neurones positifs pour la GFP (Xu *et al.*, 2004). Dans une proportion équivalente de neurones GFP, les enregistrements extracellulaires de la fréquence de décharge ont montré un effet dépendant de la dose de GnRH, inhibitrice à faible dose et activatrice à forte dose. Ces résultats suggèrent l'existence d'une boucle ultra-courte de régulation autocrine de la GnRH sur sa propre libération, qui pourrait notamment être impliquée dans la transition entre libération pulsatile et décharge massive. Enfin, une étude a mis en évidence l'expression du RGnRH par liaison d'agoniste marqué, immunoblot et RT-PCR dans une lignée immortalisée de neurones humains immatures (FNC-B4), présentant à la fois des caractéristiques de neurones olfactifs et de neurones à GnRH (Romanelli *et al.*, 2004). En outre, des effets de la GnRH ont été observés sur la croissance axonale, la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration de ces neurones, suggérant un rôle autocrine du neuropeptide *in vivo* dans la migration des neurones à GnRH au cours du développement. Cependant, un tel rôle serait absent, ou non essentiel, chez la souris. En effet, dans cette espèce, l'absence de GnRH ou de son récepteur n'affectent ni la taille, ni la distribution de la population de neurones à GnRH chez l'adulte, repérés par un gène rapporteur chez les souris *Gnrh*<sup>-/-</sup> (Gill *et al.*, 2008). En outre, chez les souris *Rosa26-Yfp x Rgnrh-Cre* (voir § 2.5.2), la protéine YFP n'est pas exprimée dans les neurones à GnRH hypothalamiques (Wen *et al.*, 2010).

### 3.3.2. L'hippocampe

L'hippocampe est très certainement la zone du cerveau où le RGnRH et son ARNm sont les plus abondants (Reubi *et al.*, 1987, Jennes et Woolums, 1994). L'hippocampe est une structure paire constituée de deux régions, la corne d'Ammon et le gyrus denté, jouant un rôle majeur dans les processus de mémorisation et de codage des informations spatiales. La corne d'Ammon, subdivisée en 3 régions (CA1 à CA3), contient des neurones pyramidaux dont les corps cellulaires sont situés dans le *stratum pyramidale*. De part et d'autre, le *stratum oriens* et le *stratum radiatum* sont enrichis en prolongements dendritiques provenant de ces neurones. Les expériences de liaison ont révélé la présence de sites de liaisons abondants dans les *strata oriens* et *radiatum* chez le rat (Leblanc *et al.*,

1988), alors que les transcrits ont été mis en évidence dans le *stratum pyramidale* (Jennes et Woolums, 1994), suggérant que les neurones pyramidaux expriment le *Rgnrh*, dont le produit est ensuite transporté dans les neurites. Plus récemment, une approche par immunohistochimie a révélé la présence du RGNRH dans l'hippocampe chez la souris, l'ovin et l'homme (Albertson *et al.*, 2008a, Wilson *et al.*, 2006). Cependant, au laboratoire, nous ne sommes pas parvenus à obtenir un marquage spécifique du récepteur avec l'anticorps utilisé chez la souris et l'ovin, confirmant les difficultés d'obtention d'un anticorps fiable contre ce récepteur et nous incitant à une certaine prudence dans l'interprétation des données obtenues par immunomarquage. Par ailleurs, la présence du RGNRH dans l'hippocampe a également été mise en évidence en observant les effets biologiques induits par son activation *in vitro*. En effet, l'ajout de GnRH sur tranches d'hippocampe de rat induit des réponses électriques dans des neurones pyramidaux de la région CA1 (Palovcik et Phillips 1986, Wong *et al.*, 1990, Chen *et al.*, 1993), ainsi que la production d'IP3 (Jennes *et al.*, 1995). En outre, la GnRH induit une potentialisation à long terme (LTP) des courants post-synaptiques excitateurs associés aux récepteurs ionotropiques glutamatergiques (Yang *et al.*, 1999). De façon intéressante, les stéroïdes sexuels régulent négativement l'expression du RGNRH dans l'hippocampe de rat (Badr *et al.*, 1988, Jennes *et al.*, 1995) ainsi que la production d'IP3 induite par la GnRH (Jennes *et al.*, 1995).

D'autres observations ont démontré une implication des stéroïdes sexuels, en particulier de l'œstradiol, sur la fonction hippocampique et plus précisément sur la plasticité synaptique (pour revue : Schumacher *et al.*, 1997, Prange-Kiel et Rune, 2006), qui constitue très probablement l'une des bases cellulaires des processus cognitifs de mémorisation et d'apprentissage (Martin et Morris, 2002). Chez la ratte, l'ovariectomie induit une diminution de la densité d'épines synaptiques dans les neurones pyramidaux de la région CA1 (Gould *et al.*, 1990), dont le nombre fluctue naturellement au cours du cycle œstrien (Woolley *et al.*, 1990). L'injection périphérique d'œstradiol rétablit une densité d'épines normale dans l'hippocampe des rattes ovariectomisées (Gould *et al.*, 1990) et facilite l'induction d'une LTP dans les neurones de la région CA1 *in vivo* (Cordoba-Montoya et Carrer, 1997). Ces données suggèrent un mode d'action endocrine des stéroïdes gonadiques sur le cerveau. Par ailleurs, les neurones hippocampiques expriment la StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) et l'aromatase (Wehrenberg *et al.*, 2001), et l'œstradiol est synthétisé *de novo* par des cultures primaires et tranches d'hippocampe de rat adulte (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Un inhibiteur de l'aromatase diminue la synaptogenèse sur cultures dispersées ou tranches d'hippocampe de jeune rat, en réduisant le nombre de boutons pré-synaptiques et d'épines dendritiques. Ces effets morphologiques sont associés à une diminution de l'expression de la synaptophysine et de la spinophiline, marqueurs respectivement pré- et post-synaptique (Kretz *et al.*, 2004). Ces observations, associées à la quasi-absence d'effet suite à une application d'œstradiol exogène sur les cultures, ont conduit à la conclusion que la plasticité synaptique hippocampique dépendait de la synthèse locale d'œstradiol. Cette production locale serait, par ailleurs, également impliquée dans la croissance axonale (von Schassen *et al.*, 2006). Récemment, l'équipe de G. M. Rune, qui a publié la majeure partie des résultats cités précédemment, a démontré *in vitro* un rôle de la GnRH sur la synaptogenèse dans l'hippocampe de rat, dépendante de la production locale d'œstradiol (Prange-Kiel *et al.*, 2008). Si un

rôle de la GnRH était avéré *in vivo* et que celle-ci provienne des neurones hypothalamiques de l'axe HHG, les variations de densité d'épines dendritiques observées au cours du cycle œstrien (Woolley *et al.*, 1990) pourraient découler d'un effet direct de la GnRH, qui synchroniserait ainsi la production locale d'œstradiol dans l'ovaire et dans l'hippocampe (Prange-Kiel *et al.*, 2009).

### **3.4 Autres structures du SNC : cortex, cervelet, système olfactif, moelle épinière**

Plusieurs études ont mis en évidence la présence du RGnRH dans d'autres régions du SNC, y compris dans le cortex cérébral (pour revue : Skinner *et al.*, 2009). Dès 1975, des effets de la GnRH ont été observés sur l'activité électrique de neurones corticaux (Renaud *et al.*, 1975, Phillis et Kirkpatrick, 1980). Suggérée par ces effets biologiques, l'expression du RGnRH a été mise en évidence dans le cortex de rat adulte par liaison d'agoniste marqué (Jennes *et al.*, 1988), ainsi que par immunohistochimie et RT-PCR à la fois chez l'adulte et l'embryon (Quintanar *et al.*, 2007). Dans cette dernière étude, une réserve peut néanmoins être émise concernant la qualité du marquage anti-RGnRH, contrôlé dans l'hypophyse adulte par colocalisation avec un marquage anti-LH, qui semble diffus et plus étendu que le signal anti-RGnRH. Par la suite, ces auteurs ont observé une augmentation de la croissance neuritique induite par la GnRH sur des neurones corticaux en culture (Quintanar et Salinas, 2008). En outre, l'expression du RGnRH a été mise en évidence par immunohistochimie dans des neurones corticaux humains (Wilson *et al.*, 2006). La même étude a montré que la GnRH est capable de stimuler l'expression de la LH $\beta$  dans des cultures primaires de neurones corticaux de rat ainsi que dans la lignée humaine de neuroblastome M17 (Wilson *et al.*, 2006). Le RGnRH serait également présent dans le cortex de souris, comme le suggère une étude récente par immunohistochimie (Albertson *et al.*, 2008a). De façon étonnante, dans ces deux dernières études, les marquages dans l'hippocampe sont corrélés avec les sites précédemment mis en évidence par hybridation *in situ*. En effet, ces immunomarquages sont localisés dans de nombreux corps cellulaires du *stratum pyramidale* et non dans les *strata oriens* et *radiatum*, marqués par liaison de <sup>125</sup>I-GnRH. Une étude réalisée par le même groupe suggère également l'expression du RGnRH dans le cervelet de souris (Albertson *et al.*, 2008b). La présence du système GnRH est beaucoup mieux établie dans le système olfactif (Jennes et Woolums 1994, Jennes *et al.*, 1997, Albertson *et al.*, 2008a, Wu *et al.*, 2010), où la GnRH pourrait jouer un rôle de neuromodulateur en lien avec les comportements reproducteurs (Wirsig-Wiechmann, 2001). Enfin, hors de l'encéphale, l'expression du RGnRH a été détectée par immunohistochimie et RT-PCR dans la moelle épinière de mouton (Dolan *et al.*, 2003) et de rat (Quintanar *et al.*, 2009). En outre, une administration de GnRH diminue la gravité des symptômes chez des rats atteints d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, correspondant à une affection neurodégénérative de la moelle épinière utilisée comme modèle d'étude de la sclérose en plaques (Quintanar *et al.*, 2011). Néanmoins, bien que ce dernier effet ait été observé chez des rattes ovariectomisées, ce type d'approche ne permet pas de démontrer formellement une action directe de la GnRH sur la moelle épinière.

### 3.5 Expression du RGNRH dans la rétine et la glande pinéale

Dans les gonades et le cerveau, plusieurs études indépendantes, réalisées chez différentes espèces par des approches complémentaires, ont permis d'établir sans ambiguïté l'expression du RGNRH. A l'inverse, dans la rétine, l'expression de l'ARNm du *Rgnrh* a été mise en évidence uniquement chez une espèce de Mammifère, le campagnol (Wirsig-Wiechmann et Wiechmann, 2002). En outre, la détection du transcrit a nécessité une RT-PCR couplée à une détection par Southern-blot, suggérant qu'il est produit en quantité très faible dans ce site. D'autres données confortent cependant cette expression rétinienne du RGNRH. Chez le rat adulte, des fibres à GnRH ont été mises en évidence par immunohistochimie dans le nerf optique, le chiasma optique et la bandelette optique, qui correspond au prolongement du nerf optique vers le thalamus (Santacana *et al.*, 1996). La présence de fibres à GnRH a également été mentionnée chez le campagnol ainsi que chez le macaque rhésus (Witkin, 1987, Wirsig-Wiechmann et Wiechmann, 2002). Un traceur rétrograde injecté dans l'œil chez le rat a pu être colocalisé avec la GnRH dans des corps cellulaires situés dans le tubercule olfactif, l'*indusium griseum* et le gyrus denté, mettant ainsi en évidence des projections de fibres à GnRH entre ces régions et la rétine (Vereczki *et al.*, 2006). Enfin, chez l'homme, des troubles de la vision ont été observés chez plusieurs patients traités par un agoniste de la GnRH, le leuprolide, sans qu'une relation de cause à effet n'ait été clairement établie (Fraunfelder et Edwards, 1995).

Si, chez les Mammifères, l'expression du RGNRH dans la rétine reste encore à établir et mérite de plus amples investigations, la présence du transcrit de ce gène a en revanche été clairement établie dans la rétine de plusieurs poissons Téléostéens, notamment chez la truite Arc en ciel et chez *Haplochromis burtoni* (Madigou *et al.*, 2000, Robison *et al.*, 2001, Maruska et Tricas, 2007). Auparavant, plusieurs observations laissaient déjà supposer un rôle physiologique de la GnRH dans la rétine des Téléostéens. Tout d'abord, la présence de fibres à GnRH dans le nerf terminal innervant directement la rétine avait été démontrée chez plusieurs espèces (Münz *et al.*, 1982, Stell *et al.*, 1984). D'autre part, plusieurs types cellulaires comme les cellules ganglionnaires (Walker et Stell, 1986), les cellules horizontales et les cellules amacrines (Umino et Dowling, 1991), émettent des signaux électriques en réponse à la GnRH. Une étude récente visant à préciser les cellules cibles de la GnRH dans la rétine d'*Haplochromis burtoni* a permis de détecter le transcrit d'un premier type de récepteur dans la couche de cellules amacrines (Grens *et al.*, 2005). En outre, l'expression d'un second type de récepteur a été observée dans une majorité de cellules ganglionnaires. L'ensemble de ces observations suggère que la GnRH pourrait jouer un rôle modulateur de la vision chez les poissons. En outre, dans la glande pinéale ou épiphyse, un organe fonctionnellement et structuralement apparenté à la rétine, le transcrit du *Rgnrh* a été mis en évidence chez le bar européen par hybridation *in situ* (González-Martínez *et al.*, 2004b), et la cGnRH-II s'est révélée capable de stimuler la libération de mélatonine (Servili *et al.*, 2010). Chez les Mammifères, bien que l'expression du RGNRH dans la glande pinéale n'ait jamais été formellement démontrée, l'adjonction de GnRH à des glandes pinéales de rat en culture entraîne la libération de mélatonine dans le milieu, suggérant à nouveau l'existence d'un récepteur fonctionnel (Itoh *et al.*, 2003).

### 3.6 Le système GnRH dans les cellules et tissus tumoraux

Des analogues de la GnRH sont utilisés depuis plus de 30 ans en thérapeutique humaine pour traiter certaines formes de cancers hormono-dépendants, en particulier des cancers du sein et de la prostate (Falcone *et al.*, 1982, Furr et Nicholson, 1982, Emons et Schally, 1994, Vacher, 1995). En effet, l'administration massive et continue d'analogues superactifs de la GnRH inhibe la fonction gonadique (voir § 1.1.1.c), et par conséquent la production de stéroïdes stimulant le développement de ces tumeurs. L'action anti-tumorale de la GnRH est donc majoritairement imputable à un effet classique de castration chimique opéré au niveau des cellules gonadotropes hypophysaires. Cependant, certaines observations, en particulier la présence du système GnRH en dehors de l'hypophyse mais également le fait que des femmes ménopausées soient sensibles à un traitement anti-tumoral par des analogues de la GnRH (Plowman *et al.*, 1986), ont conduit à émettre l'hypothèse d'un effet direct de ces drogues sur les cellules tumorales. Des études déjà anciennes avaient permis de démontrer l'existence de sites de liaison pour la GnRH dans des tumeurs mammaires humaines (Eidne *et al.*, 1985), ainsi que la capacité de la GnRH à freiner la croissance d'une lignée tumorale mammaire humaine (Miller *et al.*, 1985). Désormais, on sait que de nombreux tissus tumoraux (et lignées cellulaires dérivées de tumeurs) expriment le RGnRH, par des études réalisées en très grande majorité à partir de matériel humain (pour revue : Hapgood *et al.*, 2005). Outre la prostate et le sein, l'expression du récepteur est avérée dans certaines tumeurs de l'ovaire et de l'endomètre (Kakar *et al.*, 1994b, Imai *et al.*, 1994). Dans ces tumeurs, l'expression du récepteur est généralement associée à celle de la GnRH, suggérant un mode d'action autocrine/paracrine de ce couple. De plus, contrairement au récepteur hypophysaire, principalement couplé à la protéine Gq/G<sub>11</sub>, dans les cellules tumorales le RGnRH serait préférentiellement couplé à la protéine Gi (Imai *et al.*, 1996, Gründker *et al.*, 2001). Parmi les mécanismes moléculaires en jeu dans les effets de la GnRH, l'activation du récepteur induirait une inhibition de la croissance tumorale en interférant négativement avec l'activité mitogène des récepteurs aux facteurs de croissance de type EGF (Gründker *et al.*, 2001 ; pour revue : Emons *et al.*, 2003, Limonta *et al.*, 2003). En outre, l'inhibition de la croissance tumorale pourrait également passer par un effet pro-apoptotique de la GnRH (Kraus *et al.*, 2004). Sur ce point, d'autres études suggèrent au contraire l'induction d'un effet anti-apoptotique par la GnRH, *via* l'activation de NFκB (Gründker *et al.*, 2000, Emons *et al.*, 2003). Comme cela a déjà été évoqué au sujet des lymphocytes T (voir § 3.2), la GnRH pourrait réduire la capacité migratoire et invasive des cellules cancéreuses, en affectant l'expression et/ou l'activité des molécules d'adhésion cellulaire et des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Chen *et al.*, 2002, Moretti *et al.*, 2002 ; pour revue : Cheung et Wong, 2008). Compte tenu de l'intérêt thérapeutique, actuel et potentiel, que représentent les analogues de la GnRH, l'étude du système GnRH dans les tumeurs continue de faire l'objet d'études intensives, à l'origine des nombreuses données acquises récemment dans ce domaine.



### 3.7 Rôles du système GnRH de type II

Chez l'homme, le gène codant le RGNRH de type II contient un codon stop prématuré, rendant impossible la synthèse d'un récepteur fonctionnel (Millar *et al.*, 2004). Néanmoins, un produit potentiel de ce gène, correspondant à un fragment C-terminal du récepteur, est capable d'inhiber l'expression du RGNRH de type I *in vitro* (Pawson *et al.*, 2005). Cet effet suggère un rôle régulateur du gène codant le RGNRH-II humain en cas de coexpression avec le récepteur de type I. En revanche, contrairement aux Rongeurs de laboratoire, l'espèce humaine possède un gène codant une GnRH-II fonctionnelle (White *et al.*, 1998). Dans le système nerveux central, ce peptide a été détecté dans la région périaqueducale, les noyaux oculomoteurs et le noyau rouge du cerveau moyen (Chen *et al.*, 1998). En outre, l'ARNm de la GnRH-II a été détecté dans le noyau caudé, l'hippocampe et l'amygdale (White *et al.*, 1998). Cependant, contrairement à la GnRH-I, la GnRH-II serait majoritairement présente dans des organes périphériques, où elle agirait essentiellement de façon autocrine ou paracrine (pour revue : Cheng et Leung, 2005). La plupart des effets de la GnRH-II ont été mis en évidence par des approches *in vitro* sur du matériel d'origine humaine. Parmi les effets recensés, la GnRH-II stimulerait les processus d'adhésion et de migration des lymphocytes T (Chen *et al.*, 2002), et modifierait la balance MMP/TIMP dans des cellules trophoblastiques (Chou *et al.*, 2003a). De plus, la GnRH-II inhiberait la prolifération de cellules tumorales ovariennes et endométriales (Gründker *et al.*, 2002). Elle serait également capable d'inhiber la stéroïdogénèse induite par la LH dans la lignée humaine GLC (Granulosa-Luteal cells), en réprimant l'expression des récepteurs des gonadotropines LH et FSH (Kang *et al.*, 2001). Cependant, il semble que la grande majorité des effets de la GnRH-II connus à ce jour ne soient pas spécifiques et puissent être reproduits par la GnRH de type I (Cheng et Leung, 2005). En l'absence de RGNRH de type II, la GnRH-II pourrait agir *via* le RGNRH de type I. En effet, par définition, le RGNRH-I présente une meilleure affinité pour la GnRH-I, mais peut néanmoins être reconnu et activé par des doses physiologiques de GnRH-II (Flanagan *et al.*, 1994). Ce mode d'action pourrait sous-entendre une redondance fonctionnelle entre les deux types de GnRH. A ce jour, les rôles de ce peptide en physiologie et pathologie humaines nécessitent d'être mieux définis.

## IV. OBJECTIFS GENERAUX

La régulation de l'expression du *Rgnrh* constitue le lien entre les travaux précédemment effectués au laboratoire et la réalisation de mon projet de thèse. J'ai ainsi poursuivi le décryptage des combinatoires transcriptionnelles impliquées dans l'expression du *Rgnrh* de rat dans les cellules gonadotropes, avec pour premier objectif de compléter les données relatives à la réponse du promoteur aux facteurs à homéodomaine, notamment les protéines LIM à homéodomaine ISL1 et LHX3. Cette étude m'a conduite à réexaminer le rôle d'éléments localisés dans les régions proximale et distale du promoteur, en particulier un élément de l'enhancer distal précédemment identifié comme liant un facteur de type GATA.

L'étude des sites d'expression extra-hypophysaires du *Rgnrh* a constitué le deuxième grand axe de mes travaux de recherche. Concernant ce point, j'ai bénéficié de l'outil d'investigation puissant offert par le modèle transgénique *Rgnrh-hPLAP*. En couplant l'analyse de ce modèle à d'autres approches expérimentales, j'ai approfondi l'étude de l'expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe, région cérébrale jouant un rôle central dans la mémoire et le codage des informations spatiales. J'ai également recherché d'autres sites d'expression et découvert deux sites plus inattendus, la rétine et la glande pinéale.

Dans un premier temps, mon objectif principal fut de déterminer les caractéristiques spatio-temporelles précises de l'expression du *Rgnrh* au cours du développement et chez l'adulte. Cette diversité des sites d'expression soulevait plusieurs questions : celle des mécanismes qui président à l'expression du gène mais également celle du rôle du récepteur et de son ligand dans ces différents tissus. Compte tenu du rôle majeur du RGnRH dans l'hypophyse, ces rôles extra-hypophysaires pouvaient être liés à la fonction de reproduction, dont le succès dépend de nombreux mécanismes comportementaux et physiologiques. L'action pleiotropique du RGnRH, suggérée par la multiplicité de ses sites d'expression, pourrait permettre la synchronisation de tels mécanismes.

## V. RESULTATS

Les différents articles seront précédés d'une présentation succincte, rappelant les objectifs propres à chaque étude, les résultats marquants et les conclusions principales.

### **1. Article 1 : Core TAAT motifs confer to LIM Homeodomain proteins a predominant regulatory role over GATA factors in the cell-specific expression of the Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene.**

*En préparation*

**Anne-Laure Schang, Anne Granger, Christian Bleux, Marie-Claude Chenut, Raymond Counis, Joelle Cohen-Tannoudji, Jean-Noël Laverrière**

---

Les travaux du laboratoire ayant conduit à la découverte de l'élément de réponse aux protéines LIM à homéodomaine (LIRE) situé sur l'enhancer distal ont également permis de prédire l'existence d'autres éléments de réponse aux protéines LIM-HD au sein du promoteur. En effet, la délétion de cet élément, si elle diminue la capacité de réponse aux protéines ISL1 et LHX3, ne l'abolit pas (Granger *et al.*, 2006). Ces protéines constituent, *via* des interactions spécifiques, un code transcriptionnel que l'on retrouve, au cours du développement, dans d'autres tissus comme par exemple les motoneurons de la moelle épinière, les incisives, le pancréas ou le muscle cardiaque (Hunter et Rhodes, 2005). La fonction des protéines LIM-HD n'est donc pas restreinte à un seul tissu. La compréhension des mécanismes d'action et de la fonction de ces protéines dans l'hypophyse pourrait, par conséquent, faire évoluer les connaissances dans d'autres domaines. En outre, chacun des multiples éléments de réponse aux protéines LIM-HD dans le promoteur du *Rgnrh* pourrait présenter des spécificités différentes et être impliqué dans des fonctions variées au cours du développement et chez l'adulte. Il est donc important de les caractériser, compte tenu du rôle probable des protéines LIM-HD dans l'émergence précoce du *Rgnrh* au cours du développement mise en évidence au laboratoire (Laverrière *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, nous avons entrepris d'identifier les éléments LIRE additionnels dans le promoteur, en mettant en œuvre des transfections transitoires dans la lignée gonadotrope  $\alpha$ T3-1. Les premières expériences ont permis de localiser, dans la région 5' de l'enhancer distal (5'GnSE), un second élément impliqué dans la réponse à ISL1 et LHX3. Ce nouvel élément a été nommé D-LIRE en raison de sa position distale par rapport au premier élément LIRE identifié dans le 3'GnSE. Une approche de chromatographie d'affinité a permis de mettre en évidence une interaction entre l'élément

D-LIRE et le facteur LHX3 *in vitro*, facteur dont le rôle dans l'activation du D-LIRE a été formellement démontré par l'effet inhibiteur du dominant négatif KRAB-LHX3 dans les cellules  $\alpha$ T3-1. A l'image du P-LIRE, Le D-LIRE serait activé spécifiquement par le dimère LHX3/ISL1, avec lequel SF1 agirait également en synergie. Or, la caractérisation de cette région promotrice avait déjà été initiée au laboratoire, notamment par une approche d'EMSA démontrant la fixation d'un élément GATA sur cette séquence (Pincas *et al.*, 2001a). Cette donnée nous a conduits à évaluer le rôle des facteurs GATA vis-à-vis de cet élément et, plus généralement, dans l'activité du promoteur du *Rgnrh*. De façon plutôt inattendue, les facteurs GATA se sont révélés inhibiteurs de l'activité promotrice du *Rgnrh* dans les lignées  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2, en particulier GATA2 et GATA3, impliqués dans le développement du lignage gonadotrope (Dasen *et al.*, 1999, Charles *et al.*, 2006). L'élément D-LIRE identifié dans le promoteur de rat étant hautement conservé chez la souris, nous avons mis en œuvre une approche d'immunoprécipitation de la chromatine dans les lignées  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2, qui ont permis d'observer une liaison de LHX3, et, dans une moindre mesure, d'ISL1, sur le promoteur du *Rgnrh in vivo*. En outre, nous avons récemment observé une interaction entre GATA2 et ce promoteur uniquement dans les cellules L $\beta$ T2, où l'expression de ce facteur s'est révélée bien plus élevée que dans la lignée  $\alpha$ T3-1. Ces données nous ont conduits à évaluer la capacité de l'élément D-LIRE à interagir avec GATA2 dans les cellules L $\beta$ T2, par chromatographie d'affinité et EMSA. Ces analyses sont actuellement en cours. Nous envisageons également d'évaluer l'influence de siRNA (petits ARN interférents) spécifiques des facteurs GATA sur l'activité du promoteur et de l'élément D-LIRE.

Ainsi, l'élément D-LIRE semble être la cible de facteurs multiples, incluant des facteurs LIM-HD mais également SF1 et des facteurs GATA. Les facteurs LIM-HD, en synergie avec SF1, jouent un rôle clairement activateur, tandis que la surexpression des facteurs GATA inhibe l'activité promotrice. Nos observations différentes dans les lignées  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2 suggèrent que ces facteurs pourraient agir sous forme de combinaisons variables au cours du développement. Certains aspects seront plus particulièrement développés dans les § 1.1.1 (protéines LIM-HD), 1.1.4 (facteurs GATA) et 1.1.5 (SF1) de la partie « VI-Discussion ».

**Core TAAT motifs confer to LIM Homeodomain proteins a predominant regulatory role over GATA factors in cell-specific expression of the Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene.**

Anne-Laure Schang, Anne Granger, Christian Bleux, Marie-Claude Chenut, Raymond Counis, Joelle Cohen-Tannoudji, Jean-Noël Laverrière.

*Université Paris Diderot Paris 7, EAC CNRS 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 4 rue MA Lagroua Weill-Hallé 75205 Paris cedex 13, France.*

**Short title:** LIM-HD and GATA factors interactions on the *Gnrhr* promoter

**Key words:** GnRH receptor, transcription factors, LIM-homeodomain proteins, GATA binding proteins

**To whom correspondence, proofs, and requests for reprints should be addressed:**

Dr Jean-Noël Laverrière, Université Paris Diderot Paris 7, EAC CNRS 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'axe gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 4 rue MA Lagroua Weill-Hallé 75205 Paris cedex 13, France.

Tel: 33 1 57 27 84 06

Fax: 33 1 57 27 84 14

[jean-noel.laverriere@univ-paris-diderot.fr](mailto:jean-noel.laverriere@univ-paris-diderot.fr)

## Abstract

The GnRH receptor (GnRHR) plays pivotal role in the control of reproductive function in mammals. Its efficiency is highly dependent upon the number of receptors at the surface of the gonadotrope cells in the pituitary gland, that is ultimately regulated at the transcriptional level. Factors belonging to GATA and LIM homeodomain families are involved in gonadotrope differentiation and suspected to activate marker genes of this lineage. Here, we describe a novel cis-acting element, referred to as D-LIRE, in the distal promoter of the rat and mouse *Gnrhr* that possesses the peculiarity to interact with both LIM homeodomain proteins (LIM-HD) and GATA factors. Using transient transfection in gonadotrope  $\alpha$ T3-1 cell line, we show that LIM-HD proteins, LHX3 and ISL1, activated the promoter *via* this element. EMSA as well as DNA affinity chromatography experiments further demonstrated that LIM-HD proteins physically interacted with D-LIRE through 2 TAAT core motifs *in vitro*. Unexpectedly, in the present study, GATA factors exerted opposite effects to LIM-HD proteins by repressing promoter activity in overexpression experiments. Mutations of TAAT core motifs converted the repressive effect of GATA factors into a stimulatory influence, highlighting the predominant role of LIM-HD motifs. Moreover, ChIP assays using the L $\beta$ T2 gonadotrope cell line that expresses spontaneously high level of GATA2 demonstrated *in vivo* interaction of GATA2 and LHX3 with D-LIRE. This equilibrium between activating and repressing factors might result in a poised state sensitive to subtle modulation of the cell context and thus contributing to fine tuning of *Gnrhr* promoter activity.

## Introduction

In mammals, the gonadotrope function governs the emergence of the reproductive function at puberty, its regulation during adult life, and its decline in the ageing animal. To fulfill these processes, the gonadotrope cells in the anterior pituitary integrate multiple inputs. Among them, the hypothalamic GnRH is known to exert a major control on LH and FSH production by the pituitary in the adult animal. Through the peripheral blood circulation, these hormones regulate gonadal activity, including gametogenesis, steroidogenesis, and the ovarian cycle in the female (1).

To mediate its action, the neurodecapeptide GnRH acts through a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor, the expression of which is restricted to the gonadotrope cell lineage in the pituitary. While the pituitary gland contains 6 different endocrine cell types, cell-specific expression of the GnRH receptor (GnRHR) appears decisive for ensuring the specificity of the gonadotrope response. Therefore, the mechanisms that underlie the gonadotrope-specific expression of the GnRHR gene (*Gnrhr*) constitute critical cues for proper achievement of the reproductive function. These mechanisms likely implicate factors that are key components of the gonadotrope differentiation pathway and their study would shed light on the processes that trigger pituitary development and ontogenesis.

In an attempt to characterize the mechanisms that underlie the tissue-specific and regulated expression of the rat *Gnrhr* in both adult and developing animals, the promoter has been isolated and characterized (2). Promoter activity appears highly dependent on motifs that are present in the proximal domain (-475/-32), (numbering is starting at the ATG translation start codon, the adenine being considered at position +1), notably the elements that respond to CREB, AP1, and steroidogenic factor 1 (SF1), a transcription factor involved in late stages of gonadotrope lineage differentiation (3) (Figure 1A). Promoter activity is further dependent on a distal enhancer region referred to as *Gnrhr* specific enhancer (GnSE) extending from -1063 to -826 bp that requires cooperation with proximal elements for activating basal *Gnrhr* gene expression in gonadotrope cells (4). The GnSE constitutes a bipartite enhancer with independent response elements localized in the 3' and 5' domains. The 3'downstream element (-873/-852), thereafter referred to as P-LIRE, has been previously characterized and shown to bind the heterodimer complex formed by the LIM homeodomain (LIM-HD) proteins LHX3 and ISL1 (5). Importantly, these LIM-HD factors are involved in early stages of pituitary differentiation, in contrast with SF1. The second active element localized in the 5' part of the GnSE

has been suggested to bind GATA-related factors since efficient competition was observed with heterologous GATA consensus sequence in EMSA (4). Similarly to LIM-HD protein and SF1, GATA2 factor is thought to be involved in gonadotrope cell lineage differentiation (6,7), pointing out the strong connection between factors involved in *Gnrhr* expression and gonadotrope cell differentiation.

Interestingly, these factors are also active on the *Gnrhr* promoter of other species. In addition to AP1 and CREB, the proximal SF1 element appears critical not only for rat but also for mouse and human promoter activities (8,9). Moreover, a mouse homolog of the rat P-LIRE element has been identified. It was found to be active in transient transfection assays using the  $\alpha$ T3-1 gonadotrope cell line and to bind LHX3 in ChIP assay (10). However, the mouse motif is localized in the proximal promoter (-363/-342) contrasting with the distal localization of the rat sequence. Consequently, the activity of the mouse promoter is apparently restricted to the proximal domain that extend from -492 to -10, the most upstream element characterized being the GRAS element (-391/-380) (11,12). Concerning the 5'GnSE, no equivalent mouse homolog has been described until now and, despite previous investigation, the data regarding this element in the rat promoter remain unsatisfactory, notably those concerning the identity of the factor(s) that interact(s) with this sequence (4).

To gain further insights into the mechanisms that control *Gnrhr* expression during pituitary ontogenesis and in the adult animal, we have generated a mouse transgenic model expressing the human placental alkaline phosphatase gene under the control of the rat *Gnrhr* promoter (13). Using this model, we have shown that the *Gnrhr* promoter might be activated at E13.5 likely by LHX3/ISL1 acting on the P-LIRE (5). *Gnrhr* expression may thus precede the appearance of SF1 at E14. The presence of a GATA motif on the 5'GnSE, if functional, would confer to the enhancer the additional capacity to respond to GATA factors, in particular GATA2 that plays critical role in the differentiation of the gonadotrope lineage during pituitary ontogenesis as underlined above (6,7). Altogether this led us to reinvestigate in depth this issue by analyzing the rat enhancer and searching whether homologous sequence may be functional in the mouse promoter.



## Materials and Methods

### Antibodies

Rabbit anti-LXH3 polyclonal antibody (AB3202) was purchased from Chemicon International (Temecula, CA), rabbit polyclonal anti-EGR1 (sc-110), anti-GATA2 (sc-9008) and mouse monoclonal anti-GATA3 antibodies (sc-268) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), histone H3 (tri methyl K4) antibody (ab8580 - ChIP grade), histone H3 (tri methyl K27) antibody (ab6002-ChIP grade) and RNA polymerase II CTD repeat YSPTSPS (phospho S5) antibody (ab5131 - ChIP Grade) from Abcam (Cambridge, UK), rabbit anti-SF1 polyclonal antibody from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA). The monoclonal anti rat ISL1 antibody (394D5) and monoclonal anti ISL2 antibody (514H9) developed by Thomas M. Jessell and Susan Brenner-Morton were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

### Cell cultures and plasmid constructs

$\alpha$ T3-1, L $\beta$ T2 and CHO cells were maintained in monolayer cultures using high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 50  $\mu$ g/ml gentamicin at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. The *Gnrhr* promoter luciferase fusion constructs were previously described and numbered relative to the A of the ATG translation start codon considered at position +1 (2,4,5). Briefly, the pLuc3.3*Gnrhr* and pLuc1.1*Gnrhr* constructs resulted from the insertion of the -3268/-32 or -1135/-32 fragment of the 5'upstream sequence of the rat *Gnrhr* promoter into the pGL3 basic vector containing the firefly luciferase reporter gene (Promega). This promoter fragment includes the start sites of transcription previously described and all the *cis*-active elements that have been characterized in  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 gonadotrope cell lines. Activity of this construct displayed a 13- to 14-fold increase over the minimal *Prl* promoter in gonadotrope cells. Other *Gnrhr* promoter fusion constructs were obtained by 5' deletion, generating promoter fragments ending at -475 (pLuc0.44*Gnrhr*), -381, -316, -272, -222 and -180. Artificial constructs were based on three SF1-containing modules fused to either the minimal *Prl* promoter (-35/+35) or the minimal *Gnrhr* promoter (-136/-32) (see Fig. 2A and 4,5,14). Directional multimerization of the GATA-RE, D-LIRE and D-LIRE Mut1-2-3 sequences was performed as previously described before insertion into the pGL3 vector (5, Table 1). Expression vectors coding for ISL1, ISL2, ISL2-DelLIM, ISL2-DelHD were obtained from Dr. Jacques Salbert, LHX3, LHX3b and KRAB-LHX3 from Pr. Simon Rhodes, GATA4 and GATA6 from Dr

Robert Vigier. LHX5 and LHX9 expression vectors were generated in the laboratory by inserting LHX5 and LHX9 cDNA into the pcDNA3 vector (Invitrogen). The LHX5 and LHX9 cDNAs were obtained from Dr H Westphal and Dr Sylvie Rétaud, respectively.

### **Transfection assays**

Mouse gonadotrope  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells, generously provided by Dr. P. Mellon (La Jolla, CA), and CHO cells were maintained in monolayer cultures as previously described (4). For transient transfection assays, cells were transfected with LipofectAMINE2000 reagents (Life Technologies, Gaithersburg, MD) as previously described for luciferase reporter constructs (4), except that transfection mix was added to the cells prior to plating in 48- or 96-well plates. Where appropriate, cells also received 10 ng expression vector/well or an equivalent amount of control pCMV $\beta$  expression vector (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Cells were harvested 48 h after transfection and firefly and *Renilla* luciferase activities were evaluated (Promega).

### **Nuclear extracts and EMSA**

Nuclear extracts were prepared from cells and used in EMSA as previously described (4). Briefly, double-stranded rat and mouse D-LIRE oligonucleotides were designed to contain 5'-protruding ends. They were then end labeled (5 fmol) by filling-in the recessed 3'-termini with Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I using 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ [<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Les Ulis, France), and purified with a Sephadex G50 fine column. Nuclear extracts (10  $\mu$ g) and polydIdC (1  $\mu$ g) were incubated in binding buffer [20 mM HEPES, pH 7.9, 60 mM KCl, 60 mM NaCl, 1 mM EDTA, 300 mg/ml BSA, and 12% (vol/vol) glycerol] for 15 min at 4°C. Thereafter, 20 000 to 50 000 cpm of oligonucleotide probe (about 10 fmol) were added with or without an excess of unlabeled oligonucleotide, and incubation was continued at 20°C for 30 min. Protein DNA complexes were resolved on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel in Tris-borate-EDTA buffer. Gels were then dried and subjected to autoradiography.

### **DNA Affinity Purification**

DNA affinity purification was performed as previously described (5), with minor modifications. Briefly, D-LIRE, D-LIRE Mut1-2-3 and SAP octamers were biotinylated and bound to magnetic beads (Dynabeads M-280 streptavidin, Invitrogen, Dynal, Oslo, Norway). A P-LIRE-16x multimer was used in parallel as a positive control. For each sequence, 150  $\mu$ g activated beads were incubated with 675  $\mu$ g  $\alpha$ T3-1 cells nuclear extracts at room temperature for 30 min with rotation. Poly(dI-dC) was added to

the binding reaction as a nonspecific competitor. Beads were then washed and bound proteins were eluted in 30  $\mu$ l at RT for 15 min with rotation. Eluted samples were analyzed by Western blot, using 1.5  $\mu$ l (5%) or 5  $\mu$ l (17%) of each eluate, as well as 33.75  $\mu$ g (5%) of non-treated nuclear extracts.

### **Protein extracts and Western blot**

Total protein extracts were prepared from  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells. Confluent cells from 25 cm<sup>2</sup> culture flasks were rinsed twice with PBS 1X, scrapped, harvested, centrifuged and the resulting pellet was lysed in RIPA buffer. The lysate was passed 10 times in a syringe, incubated 1h at 4C and centrifuged 30 min, 4C, at 10 000 g. Proteins from supernatants (15  $\mu$ g) were analyzed by Western blot as previously described (15), using a primary antibody directed against GATA2 diluted at 1:200, and a second goat antirabbit IgG peroxidase diluted at 1:5000. Eluate samples from DNA affinity purification were analysed using anti-LHX3 or anti-SF1 antibody diluted at 1:500, and a goat antirabbit IgG peroxidase diluted at 1:1000. Immune complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Saclay, France).

### **Immunocytochemistry**

$\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells were plated on 8-well slide chambers. At 50% confluence, cells were rinsed with PBS 1X and fixed in methanol for 10 min at 4 C. Immunocytochemistry was performed as previously described (13). Rabbit polyclonal anti-GATA2 antibody was diluted at 1:50 and revealed with anti-rabbit Alexa-568 conjugated secondary antibody. Both cell lines were submitted to rigorously identical experimental procedures and exposure times (400 ms). To visualize nuclei, 4', cis-diamidino-2-phenylindol (DAPI) staining was used as a counterstain.

### **Chromatin immunoprecipitation**

Chromatin immunoprecipitation was performed essentially as described in the Abcam X-ChIP protocol with minor modifications. Briefly, cells were cross-linked with formaldehyde. To prepare nuclei, cells from 100 mm culture dish were scrapped in 10 ml buffer containing 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25% triton X-100, incubated on ice for 10 min and centrifuged for 5 min at 500 g. Nuclei were resuspended into 20 ml buffer containing 10 mM HEPES pH 7.9, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.01% triton X-100, incubated for 10 min and centrifuged as above. Nuclear pellet was resuspended in 1 ml ChIP lysis buffer and sonicated 4 times for 25 seconds at 90% setting (Vibra-Cell Sonicator equipped with a microsonde). Subsequent steps were as described in the X-ChIP protocol except that two additional washing steps with 250 mM LiCl and two others with 10 mM

Tris (HCl) pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 were performed. All washes were carried out using micro bio-spin columns (Biorad).

### **RNA preparation, reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Total RNA was isolated from  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells using Tri Reagent (Sigma-Aldrich). First strand cDNA was synthesized with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) using 1  $\mu$ g RNA as template. PCR amplifications were performed in a final volume of 50  $\mu$ l, with 1  $\mu$ l cDNA solution using a C1000 thermal cycler (Biorad). The oligonucleotide primer sequences used were as indicated in figure 5A. Real-time PCR was performed as previously described (16), using 1  $\mu$ l (2%) of each chromatin immunoprecipitation eluate (12  $\mu$ l final volume) and 1  $\mu$ l of 0.01x diluted input. Ratios were calculated by applying the following calculation:  $R(\%_{input}) = 2^{((Cp_{input1\%} - Cp_{eluate}) \times 1/2 \text{ efficiency})}$ , with standard-curve derived efficiencies obtained from LightCycler 480 software (Roche Diagnostics).

### **Statistical analysis**

Data were analyzed by one-way ANOVA. If the F test was significant, then means were compared using Tukey-Kramer's method of multiple comparisons.

## **Results**

### ***A LIM-HD response element overlapped the 5'GnSE element.***

We have previously demonstrated that the P-LIRE motif at the 3'end (-873/-852) of the distal enhancer was responsive to LHX3 and ISL1 overexpressions in the gonadotrope  $\alpha$ T3-1 cell line (5). However, deletion of this motif only partially abrogated the LIM-HD factor-induced stimulation, suggesting that further LIM-HD response elements (LIRE) were present within the rat *Gnrhr* promoter. As other homeobox-containing factors, the LIM-HD proteins bind to consensus elements containing a core TAAT motif. The rat *Gnrhr* promoter contains 33 TAAT motifs in the 1211 bp extending upstream of the ATG start site of translation. This was significantly ( $p < 0.001$ ) higher than the 13 TAAT expected from sequence composition, suggesting that some of them were functional elements in addition to those previously characterized in the P-LIRE. As observed using transient transfection in  $\alpha$ T3-1 cells, none of 8 TAAT elements present in the proximal promoter extending between -475 and -32 were able

to confer LIM-HD responsiveness in  $\alpha$ T3-1 cells (Figure 1B). The presence of the distal sequence extending beyond -475 and ending at -1135 was required. Consistent with these results, the distal enhancer (GnSE) extending from -1135 to -753 and containing 16 TAAT motifs was able alone to confer LIM-HD responsiveness when placed upstream of the minimal *Prl* promoter in both  $\alpha$ T3-1 and CHO cells contrasting with the inefficiency of proximal sequence (Figure 1C). Different fragments of the GnSE were therefore placed upstream of a minimal promoter (promoter type 1 - see figure 2A) and tested for their ability to respond to LIM-HD factors. We found here that an additional LIRE was indeed located in the 5'part of the GnSE (Figure 2B). The construct containing the -1063/-948 enhancer fragment (5'GnSE) was responsive to LIM-HD overexpression similarly as the 3'GnSE that included P-LIRE. This contrasted with the absence of response observed with the -1135/-1028 and -1135/-987 enhancer fragments.

Surprisingly, this novel LIRE overlapped the previously identified element suspected to bind factors related to the GATA family (4). Inspection of the sequence located between -994 and -960 revealed the presence of three TAAT motifs and a motif corresponding to the WGATAR consensus sequence, partially characterized in earlier study (4) (Figure 2C). We have previously shown that 10-bp mutations overlapping either the second TAAT motif (-983/-974) or the third TAAT motif together with the GATA consensus sequence led to approximately 50 to 60% decrease in enhancer activity in the context of the 1.1 kb *Gnrhr* promoter (4). The respective importance of these motifs was here reinvestigated using mutant double-stranded oligonucleotides placed upstream of a strong promoter containing two copies of the proximal -275/-226 region of the *Gnrhr* promoter fused to the minimal *Prl* promoter in the pGL3 luciferase reporter vector (promoter type 2 - see figure 2A). These constructs were tested by transient transfection as above. Obviously, among the three TAAT, only the second and third motifs appeared to be involved in promoter activity, as well as the GATA motif (Figure 2C). Indeed, mutations affecting the 5'part of the sequence between -994 and -983 were ineffective (mut5, mut4, mut1). The active sequence thus extended over 23 bp from -982 to -960. These results were well-correlated with our previous study and added further insight into the functional role of the two TAAT motifs. Furthermore, multimerization of the wild type sequence, until eight copies, led to proportional increase in promoter activity (Figure 2D). In contrast, multimerization of the TAAT-mutated sequence was ineffective. When transfected in non-gonadotrope CHO cells, wild D-LIRE multimers were ineffective, demonstrating that D-LIRE activation only occurred in a gonadotrope cell context (data non shown).

***Specificity of LIM-HD combination.***

To assess the specificity of the LIM-HD combination, several original as well as mutant forms of LIM-HD factors were tested in presence of SF1 (Figure 3A). The corresponding expression vectors were cotransfected with the pLuc1.1 *Gnrhr* into  $\alpha$ T3-1 cells and luciferase activity was monitored 48 h later. ISL2 was as much efficient as ISL1 in combination with LHX3. Deletion of the LIM or HD domain of ISL2 resulted in decreased efficiency, as expected. Similarly, the truncated isoform of LHX3, LHX3B, was inefficient. Combinations involving LHX5 or LHX9 together with ISL1 were also ineffective for stimulating promoter activity. Altogether, regarding the LIM-HD factor combination, these data indicated that the 5'GnSE element possessed the same specificity as the P-LIRE (5).

To ascertain the involvement of LIM-HD factors, the LHX3/ISL1 combination was tested in the heterologous CHO cell line using promoter containing multimerized sequences. The stimulation of promoter activity, also less dramatic than in gonadotrope cells, was nevertheless proportional to the number of multimerized sequences (Figure 3B). Finally, in the gonadotrope cells the strong activity elicited by the promoters containing multimerized sequences was inhibited by co-transfection of a dominant-negative derivative of the LHX3 protein containing a kruppel-associated box domain referred to as KRAB-LHX3 (Figure 3C). Altogether, these data strongly suggested that the 5'GnSE was the second LIRE element of the rat promoter and was thus thereafter referred to as distal LIRE (D-LIRE).

***The mouse promoter contains a D-LIRE homolog.***

Inspection of the mouse *Gnrhr* promoter revealed that a mouse homolog of the D- LIRE was present in the distal region, in addition to the P-LIRE homolog located at -363/-342. This sequence displayed full homology with the rat sequence within the active region (-953/-927 vs -986/-960, mouse vs rat, respectively) (Figure 3D). As expected, the mouse sequence elicited strong cis-acting stimulation when placed upstream of a minimal promoter and tested in a gonadotrope cell context using transient transfection (not illustrated). The absence of the first TAAT in the mouse sequence did not alter the cis-active efficiency as expected from data obtained with the rat mutant sequences. Rather, the mouse sequence is even more efficient than its rat homolog (not illustrated).

***EMSA and DNA affinity purification in  $\alpha$ T3-1 cells.***

The rat as well as the mouse D-LIRE were then analyzed by EMSA to evaluate their respective binding capacities. The rat and mouse D-LIRE double-stranded oligonucleotides were radioactively labeled and incubated with nuclear extracts from  $\alpha$ T3-1 in presence or not of an excess of various

unlabeled homologous or heterologous double-stranded oligonucleotides. In absence of unlabelled competitor, 2 and 3 shifted complexes (referred to as SC1, SC2, and SC3) were observed with the mouse and rat D-LIRE probe, respectively (Figure 4B). These complexes were gradually displaced by increasing concentrations of the homologous unlabelled competitor demonstrating the specificity of these complexes. A fourth, loosely defined complex was also observed depending on the experiment. Accurate densitometric analysis suggested that this complex was at least partly nonspecific and, accordingly, was not further considered. Heterologous competition implicating the rat labelled probe and the unlabelled mouse competitor indicated that SC3 involved the first TAAT that was absent from the mouse sequence. Heterologous competitions with D-LIREmut1 (first TAAT mutated) and D-LIRE mut2-3 (second and third TAAT mutated) were consistent with this conclusion. Similarly, competitions using the various mutant sequences (figure 4B) allowed the identification of the motif associated with the formation of each complex. Competition by an excess of D-LIRE oligonucleotide deleted of the 5 bp corresponding to the GATA motif (Gamut) prevented the formation of SC1 with the mouse wild-type probe and of SC1 and SC3 with the rat wild-type probe. Only SC2 formation was maintained, indicating that the SC2 complex involved the GATA motif. These data were supported by results with mutant labeled probes (Gamut, Mut2-3) (Data not illustrated). In conclusion, SC1 resulted from interaction with the TAAT 2 and 3, SC2 from interaction with the GATA motif and SC3 from interaction with the TAAT 1.

In attempt to identify the transcription factors involved in complex formation, we performed DNA affinity chromatography on nuclear extracts from  $\alpha$ T3-1 cells using as baits either biotinylated D-LIRE or D-LIRE Mut1-2-3 octamers fused to one copy of the -275/-226 *Gnrhr* promoter sequence. In parallel, we used a sixteen-mer P-LIRE and an octamer SAP sequence as positive and negative control, respectively. Sequences were linked to magnetic streptavidin beads and incubated with  $\alpha$ T3-1 nuclear extracts. After incubation, bound proteins were eluted and analysed by Western blot. As illustrated (Figure 4C), anti-LHX3 antibody reacted with a single protein species present in eluate originating from the D-LIRE probe. Same results were obtained with the P-LIRE probe, strongly suggesting that D-LIRE bound LHX3. In contrast, the D-LIRE probe carrying the three mutated TAAT motifs did not retain any protein immunologically related to LHX3, indicating that the TAAT motifs were specifically required for physical interaction between D-LIRE and LHX3 (Figure 4C). Similar experiments were performed using anti-ISL1 antibody (not illustrated). Under these conditions, analysis of the eluate

from the D-LIRE probe led to extremely weak signal after ISL1 immunostaining. In contrast and in agreement with our previous report (5), eluate from P-LIRE obviously contained ISL1. No positive signal was detected with eluate from the mutated D-LIRE sequence. The -275/-226 promoter sequence that is included within the mutated and wild-type D-LIRE baits encompasses the SF1 response element and was used as an internal control. As expected, experiments carried with anti-SF1 antibody resulted in unambiguous signals not only with wild-type probe but also with the mutated D-LIRE probe, indicating that TAAT mutations did not alter the binding capacity and specificity of the bait. Finally, signal was detected neither with antibody directed against EGR1, an unrelated transcription factor, nor with the negative control sequence (-260/-246) referred to as SAP, whatever the antibody tested.

Interestingly, the P-LIRE bait that did not contain any sequence related to SF1 response element, in contrast with wild-type and mutated D-LIRE probe, bound SF1. These results were consistent with functional data demonstrating that SF1 operated synergistically with LIM-HD proteins recruited at the P-LIRE (5). Experiments implicating D-LIRE were suggesting that similar phenomenon occurred between SF1 and LIM-HD proteins recruited at the D-LIRE. To ascertain this hypothesis, we designed co-transfection experiments with a simple artificial promoter containing or not D-LIRE sequence upstream of two SF1 response element (-245/-237) fused to the minimal *Prl* promoter in the pGL3 vector. When co-transfected with ISL1 and LHX3 in  $\alpha$ T3-1 cells, the luciferase activity of promoter including D-LIRE sequence, here the 5'GnSE, was minimally stimulated (1.8-fold over control) (Figure 4D). Similarly, SF1 alone stimulated luciferase activity 5.9-fold over control. In contrast, synergistic stimulation was observed when SF1 was co-transfected together with the LIM-HD proteins (15.2-fold over control). Already, the D-LIRE behave as the P-LIRE suggesting that these two parts of the GnSE operated through similar mechanisms.

***GATA factors inhibit D-LIRE and Gnrhr promoter activities in  $\alpha$ T3-1 cells.***

We consistently observed along the present study the dramatic ability of an heterologous consensus GATA sequence to displace SC2 in EMSA studies (not illustrated), thus reinforcing our previous observations (4). To assess whether this motif might confer any functional activity, we tested the transactivating ability of GATA factors on D-LIRE. To this aim, a vector consisting of 4 GATA response elements (GATA-RE) fused to the proximal *Prl* promoter was designed and used as a positive control. The wild type D-LIRE and the TAAT mutant derivative were then tested in co-transfection assays with



vectors expressing GATA2, GATA3, GATA4 and GATA6 in the non-gonadotrope CHO cells. These GATA factors were chosen because they may be expressed in gonadotrope cells as suggested from RT-PCR analysis performed on total RNA purified from  $\alpha$ T3-1 cells (Figure 5A) in agreement with data from others (17). As expected, co-transfection of the four GATA expression vectors resulted in stimulation of the positive control vector carrying the 4 GATA-RE whereas the minimal PRL promoter remained unstimulated (Figure 5B, upper panel). The stimulation was systematically greater with GATA4 and 6 than with GATA2 and 3 expression vectors. Regarding the D-LIRE, surprising results were obtained. Only the mutant form with all 3 TAAT mutated behave as a GATA responsive vector (Figure 5B, lower panel). By contrast, the wild-type sequence was repressed following overexpression of GATA2, GATA3 and GATA4 and weakly stimulated by GATA6. These data suggested that GATA factors were not involved in D-LIRE activation. Similar results were obtained in co-transfection assays using the wild type 1.1 kb promoter where overexpression of GATA2, 3 and 6 strongly inhibited promoter activity whereas GATA4 was less efficient (Figure 5C). The 3.3 kb promoter displayed analogous responses, indicating that the additional GATA motifs located far upstream did not play a major role in mediating GATA repressive effects. Therefore SC2 might be a GATA-dependent inhibitory complex.

***Chromatin conformation within the mouse promoter in  $\alpha$ T3-1 cells.***

We then performed ChIP assay on the mouse promoter in  $\alpha$ T3-1 cells. Indeed, due to its clonal origin, this gonadotrope cell line provides a homogeneous cell population. Furthermore, D-LIRE in the mouse promoter is localized at approximately 600 bp from P-LIRE, a minimal distance to distinguish binding events occurring on two distinct motifs. In contrast, in the rat promoter, these two motifs are localized in the distal GnSE at only 60 bp from each other and thus cannot be discriminated in classical ChIP assays. To evaluate chromatin conformation in the vicinity of the P- and D-LIRE, two chromatin marks of gene activity were exploited: trimethylation of lysine 4 of histone H3 (triMeK4-H3) and trimethylation of lys 27 of histone H3 (triMeK27-H3) as mark of gene activity and gene inactivity, respectively. The ratio of these two marks at the P- and D-LIRE were compared with those observed at the start sites of transcription (high gene activity) and at 8 kb upstream (low gene activity) (Figure 6A), using antibodies directed against triMeK4-H3 and triMeK27-H3 for immunoprecipitating the cross-linked chromatin. Each promoter region, approximately 200 bp, was then amplified using specifically designed primers. Obviously, the ratio between triMeK4-H3- and triMeK27-H3-immunoprecipitated DNA observed in the

vicinity of the P- and D-LIRE was equivalent to that observed at the start site of transcription with a large excess of triMeK4-H3-immunoprecipitated DNA (Figure 6B). In contrast, at 10 kb upstream, the ratio was different and close to 1, with an equal amount of the two marks (Figure 6A). From these data, we might conclude that P- and D-LIRE were in an active chromatin domain. Immunoprecipitation was performed in parallel with antibodies directed against LHX3 and ISL1. Chromatin immunoprecipitated by antibodies directed against LHX3 or ISL1 generated DNA fragments that were amplified by primers that targeted the P-LIRE. This demonstrated that not only LHX3, as documented by others (10), but also ISL1 were recruited at the P-LIRE on the mouse promoter, corroborating our previous data regarding the rat P-LIRE homolog. Also, the mouse D-LIRE recruited the LIM-HD proteins LHX3 as well as ISL1. However the signal intensity was less obvious than that observed at the P-LIRE. Finally, chromatin immunoprecipitation was performed using antibody against GATA2 and GATA3. No promoter region was amplified under these conditions (data not shown). However, data from the literature were indicating that GATA2 is less abundant in  $\alpha$ T3-1 cells than in the other gonadotrope mouse cell line L $\beta$ T2 (18). Absence of chromatin immunoprecipitation by anti-GATA antibodies could thus result from low levels of GATA factors. We then switched from  $\alpha$ T3-1 to L $\beta$ T2 cell line to address this question.

#### **GATA2 expression and *in vivo* interaction with the *Gnrhr* promoter in L $\beta$ T2 cells.**

In a first step, immunocytochemistry was performed using anti-GATA2 antibody on both cell lines under rigorously identical conditions, notably fluorescence exposure times (Figure 7A). Strong GATA2 immunoreactivity was visible in L $\beta$ T2 cells, mainly located in the cell nuclei as demonstrated by merging with DAPI counterstaining. In contrast, only weak cytosolic signal was observed in  $\alpha$ T3-1 cells, indicating that greater amounts of GATA2 were expressed in L $\beta$ T2 than in  $\alpha$ T3-1 cells. In parallel, western blot assays using total cell extracts from L $\beta$ T2 and  $\alpha$ T3-1 cells were performed, followed by immunostaining using anti-GATA2 antibody. Strong signal was detected corresponding to a 55 K protein in L $\beta$ T2 cells with an additional partner migrating at 48 K. This was close to the theoretical 50 K molecular weight of GATA2 (Figure 7B). These signals were considerably attenuated in extracts from  $\alpha$ T3-1 cells.

We thus wondered whether GATA factors would be able to modulate *Gnrhr* promoter activity in L $\beta$ T2. Co-transfection of GATA expression vectors resulted in inhibitory effects comparable to those obtained in  $\alpha$ T3-1 cells either on 1.1 or 3.3 kb *Gnrhr* promoter activities (Figure 7C). However, these inhibitory

effects were attenuated as compared to those observed in  $\alpha$ T3-1 cells, most likely due to the high preexisting levels of GATA2 factor in these cells.

Finally, ChIP assays were performed using L $\beta$ T2 cells (Figure 7D). In addition to anti-triMeK4-H3 and anti-triMeK27-H3 antibodies, which led to similar results as in  $\alpha$ T3-1, antibody directed against an active form of RNA-polymerase-II (Pol-II) was used. As expected, the transcription start site (TSS) promoter region was highly precipitated by anti-Pol-II antibodies. The D-LIRE region was also immunoprecipitated, but the signal intensity obtained by semi-quantitative PCR was weaker than in TSS region (Figure 9D). These data were confirmed by quantitative real-time PCR, revealing a 5-fold enrichment of TSS region DNA over D-LIRE region after anti-Pol-II immunoprecipitation. This indicated that under the ChIP conditions used in this study, namely chromatin shearing, the D-LIRE might be discriminated from the P-LIRE region that is localized 600 bp downstream in mouse promoter. Immunoprecipitation with anti-LHX3 antibodies revealed recruitment of LIM-HD factor not only around the TSS but also at the D-LIRE, corroborating the *in vitro* data obtained by DNA affinity chromatography. Similarly, ISL1 was recruited at the proximal (TSS) as well as at the distal (D-LIRE) *Gnrhr* promoter domain in L $\beta$ T2 cells, however with low efficiency as compared to LHX3. These data were corroborated by quantitative real time PCR. Most importantly, and contrasting to data obtained using  $\alpha$ T3-1 cells, GATA2, but not GATA3, was apparently recruited at both promoter domains, strongly suggesting that GATA2 interacted with D-LIRE together with LHX3 et ISL1. Consensus TGATAA motif next to the mouse TSS, not conserved in rat promoter, was likely implicated in the *in vivo* binding of GATA2 to the mouse proximal promoter domain.

## Discussion

We here show that the LIM-HD proteins play crucial role in the gonadotrope-specific expression of the rat and, most probably, the mouse *Gnrhr* by interacting with two response elements, the P-LIRE characterized in our previous study as well as by others, and the D-LIRE, the new element identified in the present study. Three distinct motifs were identified in D-LIRE, two TAAT (motifs 2 and 3 at -978/-975 and -971/-968) located in the vicinity of one WGATAR motif (-966/-961) suggesting that more than one transcription factor targets this regulatory element. These motifs were functionally characterized in transient transfection assays, and physical interactions with nuclear factors were supported by EMSA results. The identity of the transcription factors implicated was partially characterized by co-

transfection with expression vectors for GATA, ISL1, LHX3 and dominant negative form of LHX3 factors, *in vitro* by DNA affinity chromatography and *in vivo* by ChIP assays. Furthermore, as already observed on the P-LIRE, SF1 and LIM-HD proteins act in synergy to enhance D-LIRE activity. This partnership, which involves physical interactions, may trigger the cooperation observed between the proximal region of the rat *Gnrhr* promoter and the distal GnSE (4,5).

A set of assumptions indicates that LHX3 and GATA2 are interacting with the D-LIRE, mediating most probably opposite effects, stimulatory and inhibitory, respectively. Data concerning the involvement of ISL1 in D-LIRE transactivation are less convincing, essentially regarding those obtained by ChIP assay. Nonetheless, the most unexpected and surprising result concerns the inhibitory effect apparently mediated by GATA2. In contrast, the gene encoding the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit (*Cga*) has been previously identified as a target stimulated by GATA factors in  $\alpha$ T3-1 cells. This was established notably by transfection assays revealing GATA2/3-induced stimulation of wild-type construct correlated with blockage by targeted mutation of the WGATAR motif (17). Our present conclusion is founded on co-transfection experiments that may lead to GATA2 overexpression in transfected cells. Whether this may disrupt subtle equilibrium between GATA2 and LIM-HD proteins, switching from a stimulatory to an inhibitory complex could not be excluded. In support for such a hypothesis are data obtained with mutated constructs bearing deleted GATA motifs. These constructs were significantly less active than wild-type counterparts, indicating that the GATA motif is required for full stimulatory activity of D-LIRE.

Nevertheless, the alternate hypothesis implicating a GATA-dependent inhibition of *Gnrhr* expression deserves to be considered. Indeed, the inhibitory effect mediated by GATA2 or 3 in L $\beta$ T2 cells, that express high endogenous levels of GATA2, is less marked than in  $\alpha$ T3-1 cells, that express low levels of GATA2. The GATA-specific complex consistently observed in EMSA during this study (data not shown) as well as in our previous study, if significant, may therefore belong to a repressor rather than to an activator complex. The same conclusion may be drawn for interpreting results obtained in ChIP assays. This GATA-dependent inhibitory effect might be mediated by GATA motifs located in the distal part of the promoter namely the -966/961 motif within the D-LIRE. In favor of such a hypothesis is the decrease in the GATA-induced inhibitory effect observed with GATA mutated promoters (unpublished data). Inspection of the -1135/-32 promoter sequence reveals two additional GATA motifs at -634/-629 (TGATAA) and at -900/-894 (TGATAG), and we cannot exclude their involvement in the GATA-

dependent inhibition of rat *Gnrhr* promoter activity. Furthermore, beyond -1135, additional GATA motifs were detected, namely a 52 bp DNA consisting of 13 tandem GATA motifs in a head to tail orientation. A similar motif involving seven tandem GATA repeats, located in the locus control region of human  $\beta$ -globin gene exhibits silencer activity in erythroid cells, most probably by interacting with GATA1 (19). This is rather consistent with our data.

Taking into account the close proximity of GATA and TAAT motifs in the D-LIRE, GATA-induced inhibition of promoter activity may be mediated through steric hindrance, overexpressed GATA factors preventing access of LIM-HD proteins to their core TAAT motifs in cotransfection experiments. Conversely, under natural expressing conditions, LIM-HD proteins may prevent the access of GATA factors to GATA motif. However, in CHO cells, D-LIRE was inactive without cotransfected LHX3/ISL1 expression vectors, indicating that they do not express these LIM-HD proteins. Despite the absence ISL1 and LHX3, GATA factors did not activate D-LIRE unless the TAAT motifs were mutated. This means either that (an) unknown factor(s) operative in both  $\alpha$ T3-1 and CHO cell interact(s) with the TAAT motifs and prevent(s) the stimulatory effect of GATA factors by steric hindrance, or that the D-LIRE sequence by itself, due to TAAT motifs, is inappropriate to mediate GATA transactivation. Whatever the actual situation, the impact of TAAT motifs on GATA transacting capacity appears to be dominant.

The role of GATA factors, together with LIM-HD proteins, might be to modulate gonadotrope function through transcriptional regulation of the *Gnrhr* and subsequent regulation of the number of receptors at the cell surface once *Gnrhr* starts to be expressed. However, GATA2 is regulated by BMP2/4 signaling during pituitary ontogenesis and, thus is dependent on transitory morphogenetic gradients (6). Its expression is maintained in the adult animal, mainly in the gonadotrope and thyrotrope lineages, by yet unknown mechanisms. In that respect, comparison between  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells may shed light on such potential mechanisms. The  $\alpha$ T3-1 cells express earlier marker genes of the gonadotrope lineage, the *Cga* detected at E11.5, *Gnrhr* detected at E13.5 and *Sf1* detected at E14.5 (13,20,21,22). The L $\beta$ T2 cell line further expresses late marker genes, namely the beta subunit of LH (*Lhb*), detected at E16.5, and FSH, detected at E17.5 (21,23,24). These data together with the way whereby these cell lines have been generated - by targeted oncogenesis using the promoter of *Cga* and *Lhb*, respectively- strongly suggest that the  $\alpha$ T3-1 cell line may be representative of the gonadotrope lineage at a developmental stage between E14 and E16.5, and beyond E17.5 regarding

the L $\beta$ T2 cell line. This suggests that after an initial rise due to BMP signaling, the level of GATA2 is decreased, as observed in  $\alpha$ T3-1 cells and thereafter increases through novel signaling events that have taken place in L $\beta$ T2 cell line.

In conclusion, we have identified, in the rat *Gnrhr* promoter, a novel response element for LIM-HD proteins which could also be a target for other factors including GATA factors. These factors appear to exert antagonistic effects, by yet unresolved mechanisms which may depend on the developmental stage and cell differentiation state. This situation illustrates the complexity of the processes that govern cell-specific gene expression.

**Figure legend****Figure 1: The distal rat *Gnrhr* promoter enhancer (GnSE) sequence confers full LIM-HD responsiveness.**

**A**, schematic representation of the 1.1 kb rat *Gnrhr* promoter illustrating the location of response elements and related transcription factors characterized in previous studies. The SAP element binds a yet uncharacterized factor, different from SF1. **B**, Rat *Gnrhr* promoter luciferase fusion constructs with gradual 5' deletions from -1135 to -180 were transiently transfected into  $\alpha$ T3-1 cells, and co-transfected with expression vectors encoding for LHX3a and ISL1 (10 ng each per well of a 48-well plate) or equivalent amounts of the pcDNA3 empty vector (control). Luciferase activities were measured 48 hours later as indicated in Materials and Methods and expressed as fold stimulation over minimal *Prl* promoter activity. **C**, Distal enhancer (-1135/-753) promoter fragment or proximal -275/-226 region containing the SAP and SF1 response elements were inserted into the pGL3 plasmid vector 5' upstream of the minimal *Prl* promoter directing *Luciferase* expression and co-transfected with LHX3 and ISL1 expression vector or equivalent amounts of pcDNA3 empty vector in  $\alpha$ T3-1 and CHO cells as described above. Luciferase activity was measured and expressed as fold stimulation over minimal *Prl* promoter activity. In B and C, results are the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 2: An additional LIM-HD response element is located within the 5'GnSE between -982 and -960.**

**A**, Structure of the core promoters used in the present study. The type 1 core promoter contains 2 SF1 motifs whereas the type 2 promoter contains two SAP/SF1 response elements from the rat *Gnrhr* promoter. They are both associated to the minimal *Prl* promoter (PRLmin). The type 3 core promoter contains only one SAP/SF1 module associated to a minimal rat *Gnrhr* promoter extending from -136 to -32 (GnRHRmin). It thus contains not only the transcription start sites but also the CRE (TGACGTTT). These promoters were used to introduce minimal interferences (by reducing the number of known and unknown response elements) on the activity of the promoter fragment tested while keeping sufficient promoter activity. **B**, 5' and 3' deleted GnSE fragments were fused to the type 1 core promoter inserted 5' upstream of the Luciferase reporter gene in the pGL3 plasmid vector and tested by transient transfection in  $\alpha$ T3-1 cells as described in figure 1 legend. **C**, double-strand oligonucleotides

corresponding to the -994/-960 promoter sequence and carrying the indicated mutations (boxed/reversed) within the potential active TAAT and GATA motifs or outside (mutant 5) were designed, synthesized, and fused to type 2 core promoter. The efficiency of single and combined mutations was evaluated by transient transfection in  $\alpha$ T3-1 cells as described in figure 1 legend. **D**, Multimerisation of the D-LIRE sequence leads to proportional increase in promoter activity. D-LIRE (-994/-960) and D-LIRE mutated on the 3 TAAT motifs (Mut1-2-3) were multimerised and inserted 5' upstream of the type 3 core promoter into the pGL3 vector. Constructs containing 1 to 8 copies of each sequence were then tested by transient transfection in  $\alpha$ T3-1 cells as described in figure 1 legend.

### **Figure 3 : D-LIRE is specifically activated by LHX3 and ISL1**

All transfections (A, B, C) were performed as described in figure 1 legend. **A**, To evaluate D-LIRE specificity, several combinations of LIM homeodomain proteins or mutated variants expression vectors were co-transfected, together with SF1 expression vector, in  $\alpha$ T3-1 cells with luciferase construct directed by the 5'GnSE placed upstream of the type 1 promoter (see Figure 2A). LHX3a: active form of LHX3. ISL2 delLIM: ISL2 deleted from the LIM domains. ISL2 delHD: ISL2 deleted from the homeodomain. LHX3b: a natural variant of LHX3 that differs from LHX3a by distinct amino termini. It was shown to be inactive on the promoter of the alpha gonadotropin subunit, a well-known target of LHX3, and also poorly active on TSH beta promoter (25). Luciferase activity was measured and expressed as percent of the promoter activity obtained after co-transfection with LHX3a and ISL1 expression vector. Results are the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $p$  < 0.001; \*\* $p$  < 0.01; \* $p$  < 0.05; ns, not significant. **B**, Various constructs containing either D-LIRE or Mut1-2-3 multimers (see figure 4A for monomer sequences) were co-transfected with LHX3 and ISL1 expression vectors or equivalent amounts of pcDNA3 empty vector in CHO cells. **C**, D-LIRE multimer-directed luciferase constructs were co-transfected in  $\alpha$ T3-1 cells with a dominant-negative of LHX3, KRAB-LHX3, or equivalent amount of empty pcDNA3 vector (control). Results are the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in triplicate. **D**, Structural conservation of the LIM-HD response elements in the rat and mouse *Gnrhr* promoters. The two promoter sequences were aligned using the ClustalW2 program provided by the European Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Numbering of both promoters is starting at the ATG



translation start codon, the adenine being considered at position +1. The P-LIRE is relocated in the proximal part of the mouse promoter in the antisens strand (-). In contrast, the D-LIRE sequence is in a distal position in both promoters.

#### **Figure 4: D-LIRE interacts with LHX3 in $\alpha$ T3-1 cells**

**A**, Oligonucleotide sequences used in luciferase constructs, EMSA and DNA affinity chromatography assays. In D-LIRE, the TAAT and GATA motifs are highlighted in gray. **B**, EMSA experiments were performed on  $\alpha$ T3-1 nuclear extracts (NE) as described in Materials and Methods. All mutant competitor oligonucleotides (see figure 4A for sequences) were used at 500-fold excess. Shifted complexes (SC) are indicated by arrows. **C**, Binding capacities of D-LIRE sequence were assessed by incubating  $\alpha$ T3-1 nuclear extracts with biotinylated D-LIRE, Mut1-2-3 or SAP (control) octamers or P-LIRE 16-mer linked to streptavidin magnetic beads. Proteins specifically bound to each sequence were eluted in a 30  $\mu$ l volume. Ten percent of the  $\alpha$ T3-1 nuclear extracts used in the binding reaction and increasing amounts (1.5 and 5 $\mu$ l) of eluted samples were resolved on 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using anti-LHX3, anti-SF1 and anti-EGR1 antibodies. The migration of three ladder bands is indicated (38, 54 and 99 K). **D**, A construct containing or not the 5'GnSE placed upstream to the type 1 promoter (see figure 2A) was co-transfected with LHX3, ISL1 and/or SF1 expression vectors in  $\alpha$ T3-1 cells as described in figure 1 legend.

#### **Figure 5: GATA factors inhibit D-LIRE and *Gnrhr* promoter activities in $\alpha$ T3-1 cells**

**A**, Expression study of GATA factors by RT-PCR in  $\alpha$ T3-1 cells. Primer sequences used are indicated with sizes of the amplified products in parenthesis. **B**, GATA2, 3, 4 and 6 expression vectors were co-transfected in CHO cells with a luciferase construct directed by: Upper panel, PRLmin promoter or 4 GATA response elements (GATA-RE) fused to the PRLmin promoter. Lower panel: D-LIRE or Mut1-2-3 tetramers placed upstream of the (SAP/SF)-GnRHRmin promoter (see figure 2A). **C**, GATA expression vectors were co-transfected in  $\alpha$ T3-1 cells with 1.1 or 3.3 kb *Gnrhr* promoter directing the luciferase reporter gene in the pGL3 vector.

**Figure 6 : Chromatin immunoprecipitation assay in  $\alpha$ T3-1 cells**

Chromatin immunoprecipitation was performed in  $\alpha$ T3-1 cells using antibodies directed against GATA2, GATA3, LHX3, ISL1, ISL2, trimethylation of lysine 4 (triMeK4) and trimethylation of lys 27 (triMeK27) of histone H3. Semi-quantitative PCR was conducted by successive loadings of each PCR product after an increasing number of amplification cycles. **A**, PCR amplification at transcription start site (TSS) and at 8 kb upstream. **B**, PCR amplification of the two regions encompassing the P-LIRE and D-LIRE.

**Figure 7 : High GATA2 expression, inhibitory effect and *in vivo* binding on *Gnrhr* promoter in L $\beta$ T2 cells**

**A**, Anti-GATA2 immunocytochemistry was performed on methanol-fixed  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells. Both cell lines were submitted to identical exposure times (400 ms), allowing comparison between GATA2 expression levels. **B**, Anti-GATA2 Western blot was conducted on  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 protein extracts. The migration of two ladder bands is indicated (35 and 55 K). **C**, GATA2, 3, 4 and 6 expression vectors were co-transfected in L $\beta$ T2 cells with 1.1 or 3.3 kb *Gnrhr* promoter directing the luciferase reporter gene in the pGL3 vector. **D**, Chromatin immunoprecipitation was conducted in L $\beta$ T2 cells using antibodies directed against GATA2, GATA3, active phosphorylated form of polymerase-II (Pol-II), LHX3, ISL1, ISL2, trimethylation of lysine 4 (triMeK4) and trimethylation of lys 27 (triMeK27) of histone H3. Classical PCR amplification and real-time Q-PCR were performed by targeting the TSS and D-LIRE regions (for primer sequences, see Figure 6A).

## References

---

- 1 Counis R, Laverrière JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler ML, Magre S (2005) Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev* 45:243-254
  
- 2 Pincas H, Forrai Z, Chauvin S, Laverriere JN, Counis R (1998) Multiple elements in the distal part of the 1.2 kb 5'-flanking region of the rat GnRH receptor gene regulate gonadotrope-specific expression conferred by proximal domain. *Mol Cell Endocrinol* 144:95-108
  
- 3 Zhao L, Bakke M, Parker KL (2001) Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 185:27-32
  
- 4 Pincas H, Amoyel K, Counis R, Laverriere JN (2001) Proximal cis-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:319-337
  
- 5 Granger A, Bleux C, Kottler ML, Rhodes SJ, Counis R, Laverriere JN (2006) The LIM-homeodomain proteins Isl-1 and Lhx3 act with steroidogenic factor 1 to enhance gonadotrope-specific activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 20:2093-2108
  
- 6 Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman AS, Szeto DP, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG (1999) Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97:587-598
  
- 7 Charles MA, Saunders TL, Wood WM, Owens K, Parlow AF, Camper SA, Ridgway EC, Gordon DF (2006) Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol Endocrinol* 20:1366-1277

- 
- 8 Duval DL, Nelson SE, Clay CM (1997a) A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 56:160-168
- 9 Ngan ES, Cheng PK, Leung PC, Chow BK (1999) Steroidogenic factor-1 interacts with a gonadotrope-specific element within the first exon of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene to mediate gonadotrope-specific expression. *Endocrinology* 140:2452-2462
- 10 McGillivray SM, Bailey JS, Ramezani R, Kirkwood BJ, Mellon PL (2005) Mouse GnRH receptor gene expression is mediated by the LHX3 homeodomain protein. *Endocrinology* 146:2180-2185
- 11 Clay CM, Nelson SE, Digregorio GB, Campion CE, Wiedemann AL, Nett RJ (1995) Cell-specific expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is conferred by elements residing within 500 bp of proximal 5' flanking region. *Endocrine* 3:615-622
- 12 Duval DL, Nelson SE, Clay CM (1997b) The tripartite basal enhancer of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene promoter regulates cell-specific expression through a novel GnRH receptor activating sequence. *Mol Endocrinol* 11:1814-1821
- 13 Granger A, Ngo-Muller V, Bleux C, Guigon C, Pincas H, Magre S, Daegelen D, Tixier-Vidal A, Counis R, Laverriere JN (2004) The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* 145:983-993
- 14 Pincas H, Laverriere JN, Counis R (2001b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulate the promoter activity of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene via a bipartite response element in gonadotrope-derived cells. *J Biol Chem* 276:23562-23571

- 15 Garrel G, Delahaye R, Hemmings BA, Counis R (1995) Modulation of regulatory and catalytic subunit levels of cAMP-dependent protein kinase A in anterior pituitary cells in response to direct activation of protein kinases A and C or after GnRH stimulation. *Neuroendocrinology* 62:514-522
  
- 16 Schang AL, Ngô-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut MC, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN (2011) GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity. *Endocrinology* 152:568-580
  
- 17 Steger DJ, Hecht JH, Mellon PL (1994) GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin alpha-subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol Cell Biol* 14:5592-5602
  
- 18 Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P (2010) Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril* 93:2465-2485
  
- 19 Ramchandran R, Bengra C, Whitney B, Lanclos K, Tuan D (2000) A (GATA)(7) motif located in the 5' boundary area of the human beta-globin locus control region exhibits silencer activity in erythroid cells. *Am J Hematol* 65:14-24
  
- 20 Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL (1990) Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:597-603
  
- 21 Japón MA, Rubinstein M, Low MJ (1994) In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125
  
- 22 Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8:2302-2312

---

23 Thomas P, Mellon PL, Turgeon J, Waring DW (1996) The L beta T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology* 137:2979-2989

24 Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang HJ, Miller WL, Mellon PL (2001) Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142:2284-2295

25 West BE, Parker GE, Savage JJ, Kiratipranon P, Toomey KS, Beach LR, Colvin SC, Sloop KW, Rhodes SJ. (2004). Regulation of the follicle-stimulating hormone beta gene by the LHX3 LIM-homeodomain transcription factor. *Endocrinology* 145 : 4866-4879

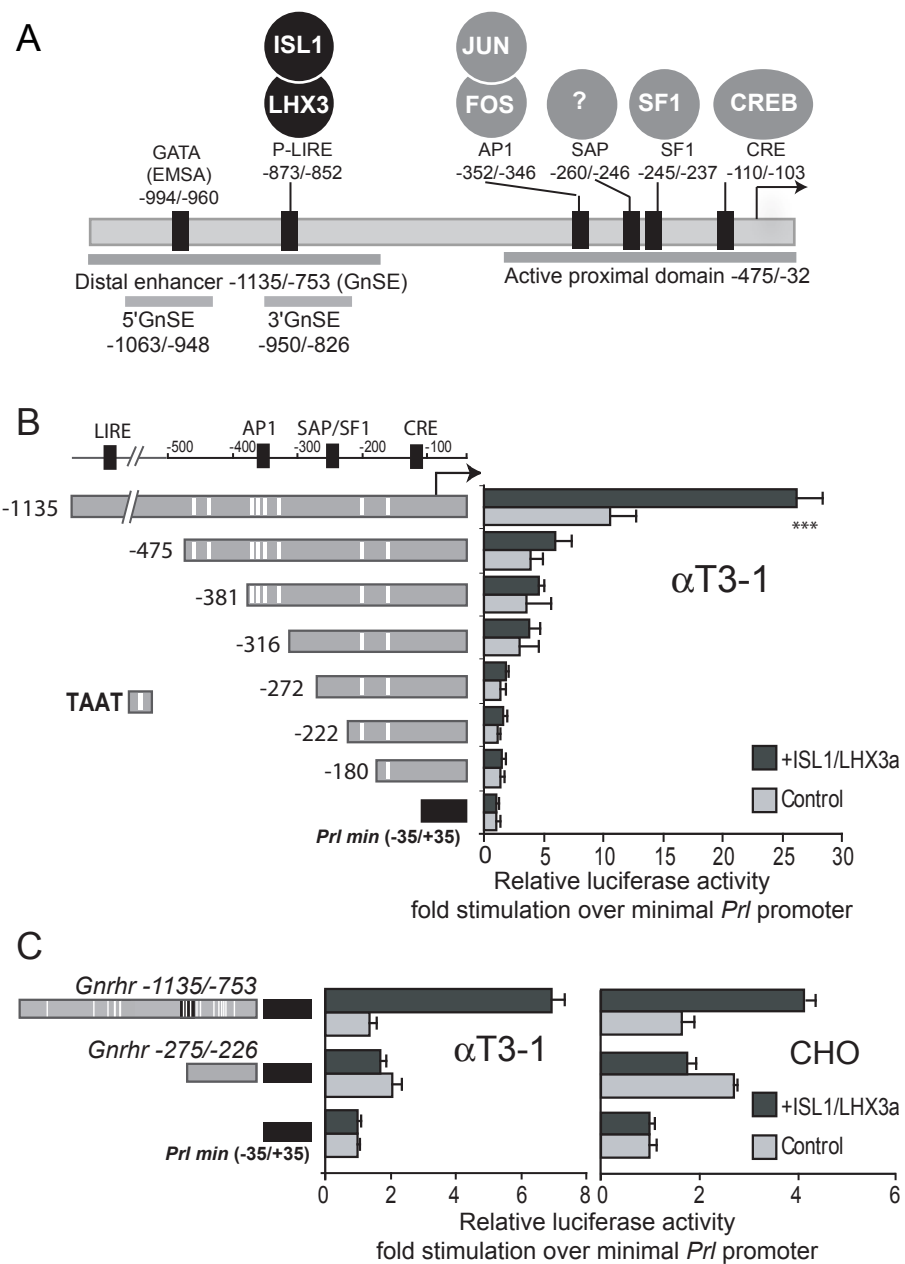


Figure 1

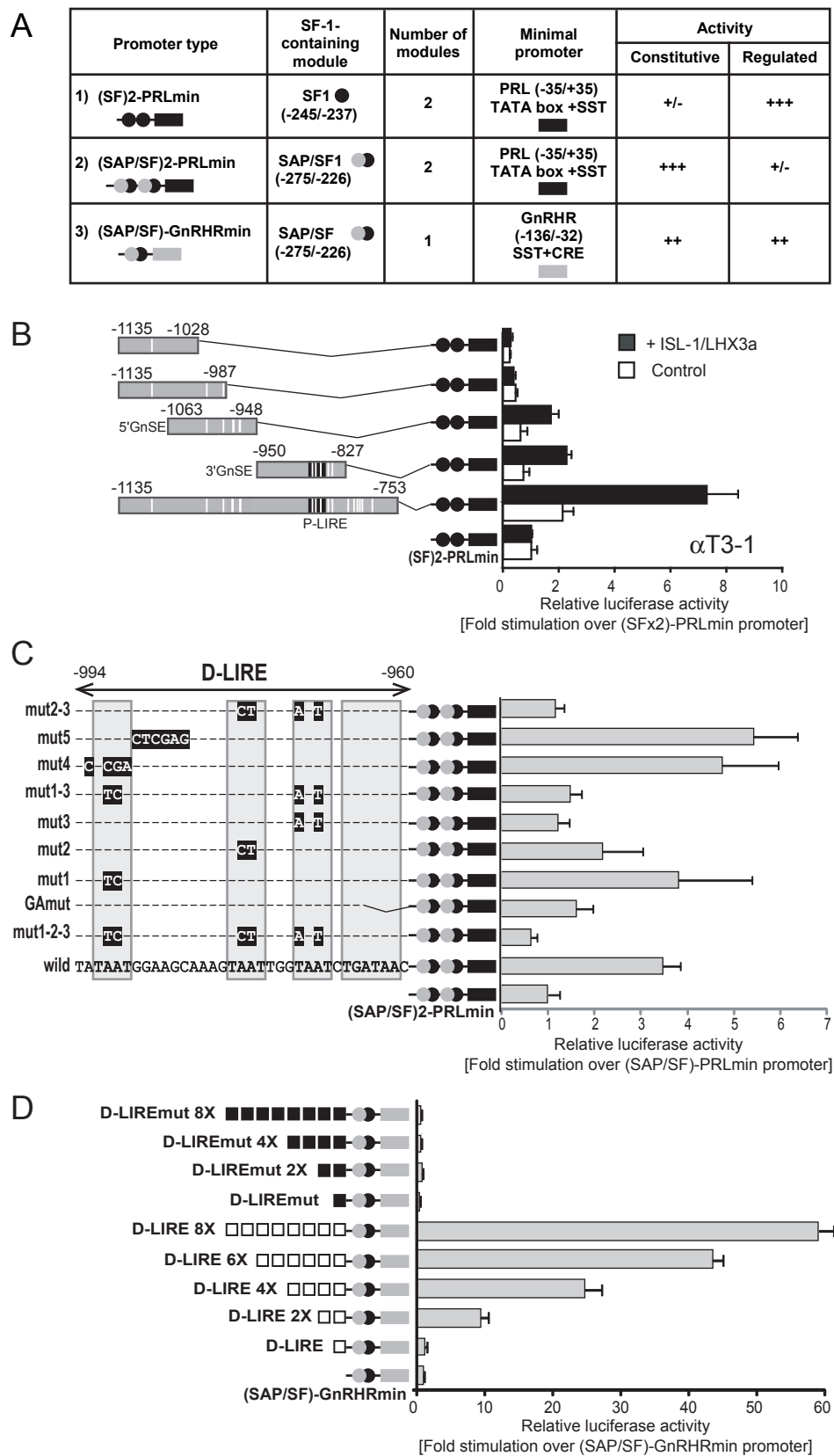


Figure 2



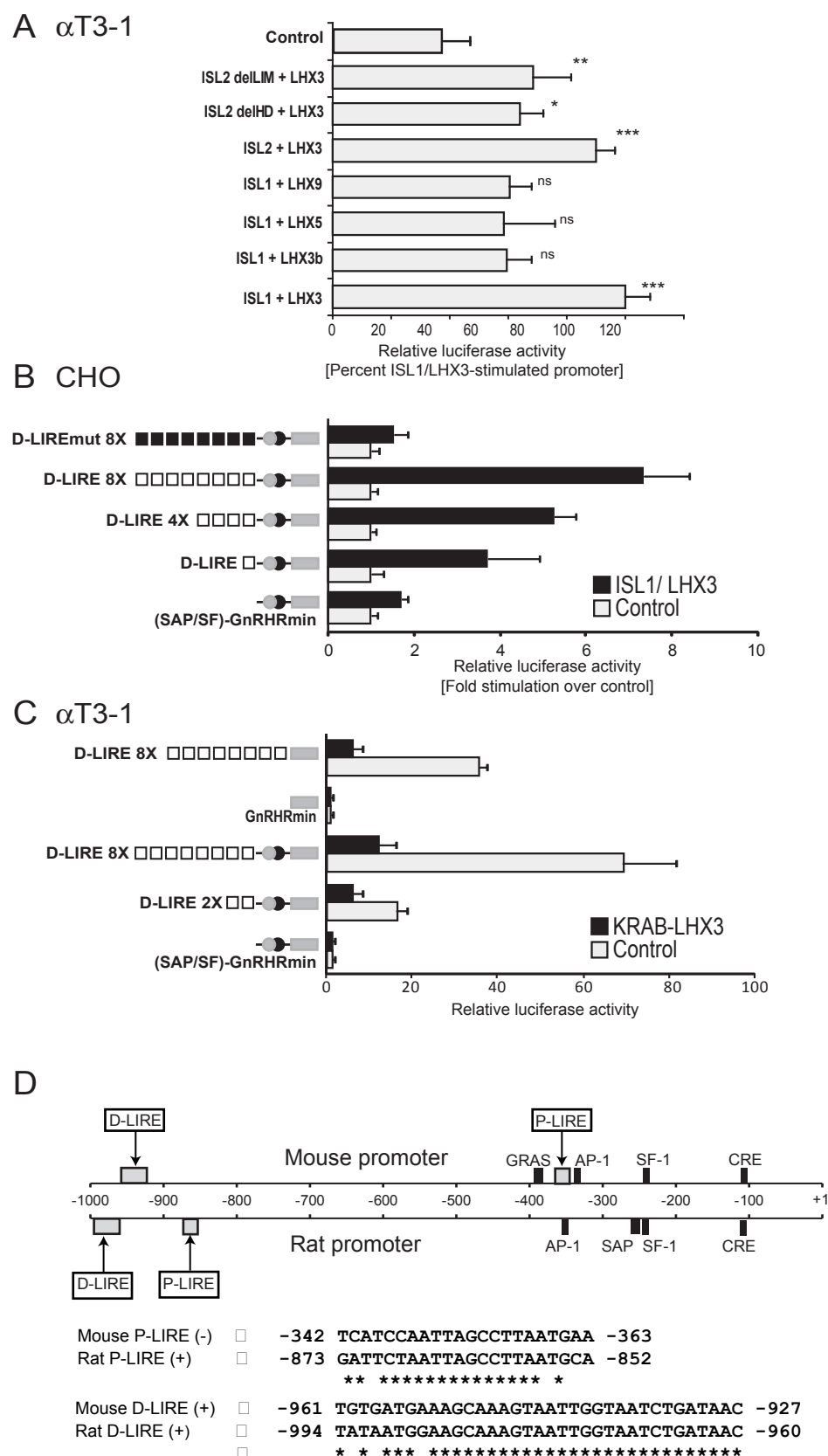


Figure 3

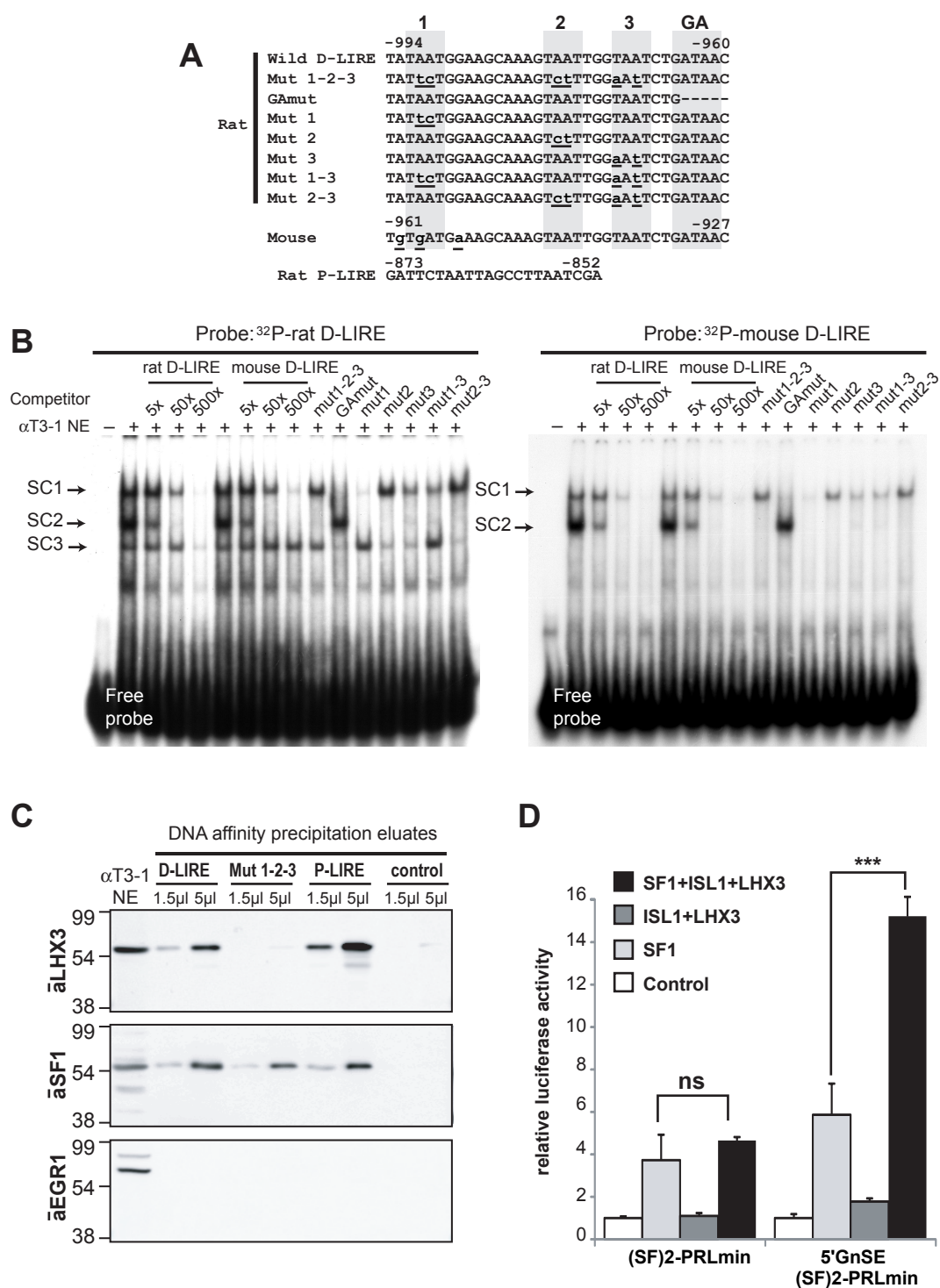


Figure 4

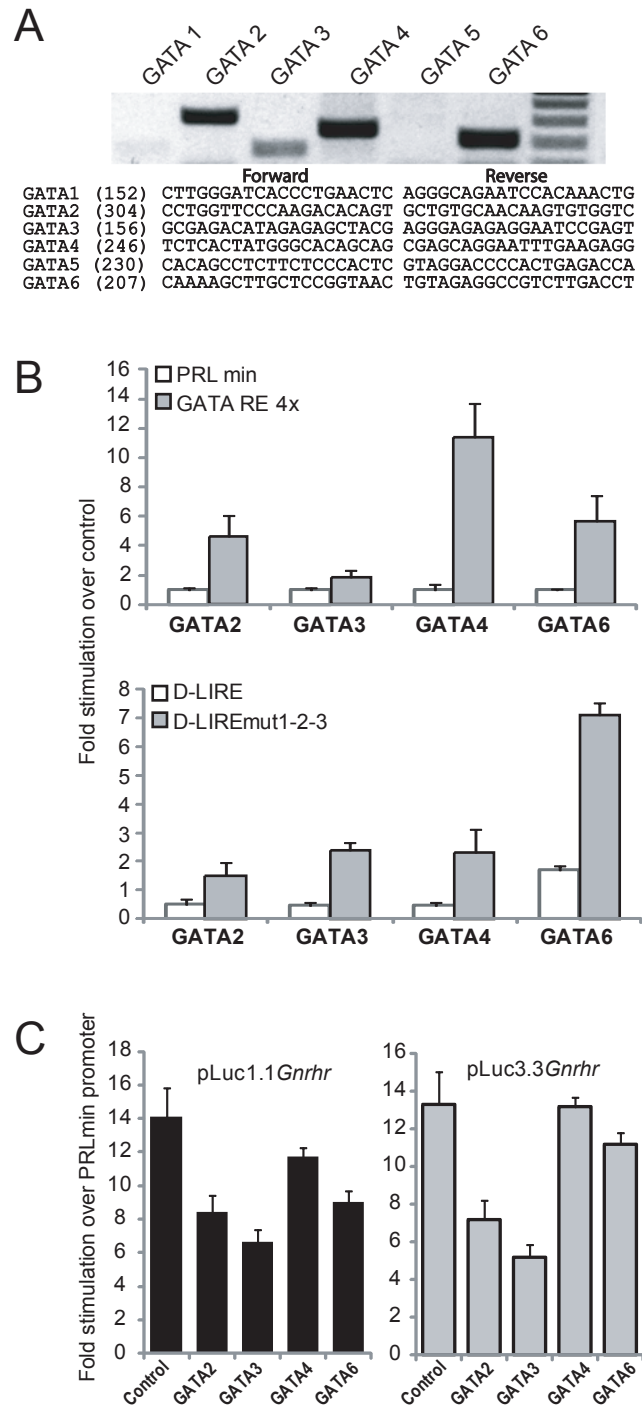


Figure 5

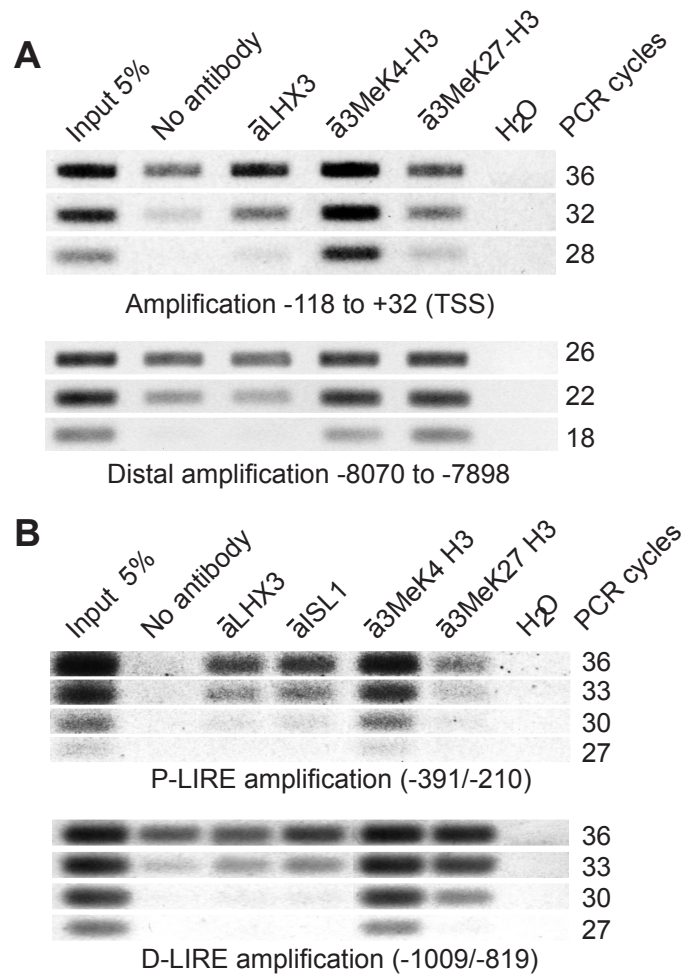


Figure 6

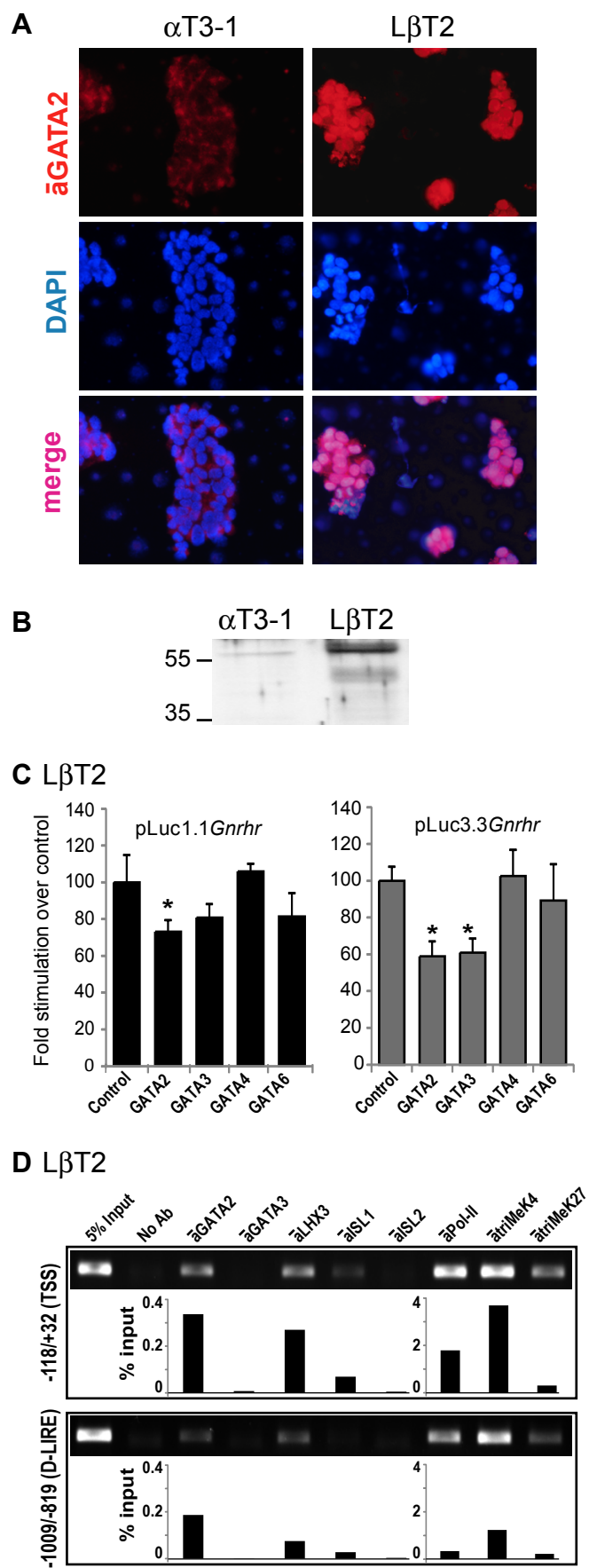


Figure 7

Table 1 – Oligonucleotides used for initiating the multimerization of GATA-RE, D-LIRE and D-LIREmut

GATA-RE sense	5'-CTAGACT <b>TGATA</b> ACACAAAG <b>TGATA</b> ACTGCTAGC-3'
GATA-RE antisense	5'-TCGAGCTAGCAG <b>TTATCA</b> CTTTGTG <b>TTATCA</b> AGT-3'
D-LIRE sense	5'-CTAGATGTGATGAAAGCAAAGTAATTGGTAATCTGATAACGCTAGC-3'
D-LIRE antisense	5'-TCGAGCTAGCGTTATCAGATTACCAATTACTTTGCTTTCATCACAT-3'
D-LIREmut sense	5'-CTAGATATTCTGGAAGCAAAGTCTTTGGAATTCTGATAACGCTAGC-3'
D-LIREmut antisense	5'-TCGAGCTAGCGTTATCAGAATTCCAAAGACTTTGCTTCCAGAATAT-3'

## **2. Article 2 : GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity.**

**Endocrinology (2011) 152:568-580**

**Schang AL, Ngô-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut MC, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN**

---

Parmi les sites d'expression extra-hypophysaires du RGnRH, l'hippocampe constitue l'un des sites les plus étudiés et les mieux caractérisés (voir § III / 3.3.2). Au laboratoire, les premières observations réalisées chez les souris *Rgnrh-hPLAP* adultes ont permis de mettre en évidence une expression du transgène dans l'hippocampe, démontrant que le promoteur de 3,3 kb de rat est capable de diriger l'expression du gène rapporteur dans plusieurs sites d'expression naturels du RGnRH (Granger *et al.*, 2006). Dans cette étude, nous avons mis à profit les avantages de ce modèle pour étudier en détail certaines caractéristiques de l'expression du RGnRH hippocampique. En particulier, nous nous sommes intéressés à la période du développement postnatal, cruciale dans le cerveau, pendant laquelle se mettent notamment en place certaines projections réciproques entre l'hippocampe et le septum (Linke *et al.*, 1995, Martínez et Soriano, 2005). Pour la première fois, nous avons étudié la cinétique d'expression du *Rgnrh* au cours du développement postnatal dans l'hippocampe de rat, et avons observé une apparition puis une augmentation de l'expression du transcrit, particulièrement élevée pendant les deux premières semaines postnatales. Cette donnée importante suggère un rôle de la GnRH dans le processus de maturation cérébrale néonatale. De façon intéressante, nous avons pu corréler cette observation avec la cinétique d'expression du transgène dans l'hippocampe des souris *Rgnrh-hPLAP*, nous autorisant à pousser plus loin nos investigations en utilisant ce modèle. Grâce à la sensibilité et à la haute résolution de détection du transgène, nous avons ainsi pu établir une continuité de l'expression du transgène entre l'hippocampe et le septum latéral, mais également localiser l'activité promotrice du *Rgnrh* dans une sous-population de neurones hippocampiques à la fois *in situ* sur coupes de cerveau et *in vitro* sur cultures dissociées.

Deux questions principales ont dirigé la suite des recherches : Comment l'expression du *Rgnrh* est-elle régulée ? Quelles sont les fonctions du récepteur hippocampique ? Concernant le premier point, nous avons entamé l'étude des mécanismes régulant l'expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe et avons ainsi observé d'importantes différences entre le code transcriptionnel en jeu dans l'expression gonadotrope de ce gène et celui impliqué dans les cellules hippocampiques. L'une des particularités de cette expression réside dans sa cinétique radicalement différente de l'expression dans l'hypophyse, où l'activité du transgène *Rgnrh-hPLAP* est détectée dès E13,5 (Granger *et al.*, 2004). Une approche de transfection transitoire dans des cultures primaires d'hippocampes de rat a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence de mécanismes réprimant l'expression du *Rgnrh* chez l'embryon, auxquels pourrait participer le facteur REST. Cependant, la question majeure réside dans

le rôle que pourrait jouer le RGnRH dans l'hippocampe. Dans cette optique, nos travaux ont permis d'observer un rôle modulateur de la GnRH sur l'expression de plusieurs gènes marqueurs de la plasticité synaptique. Ces résultats sont en accord avec une étude récente démontrant l'implication du RGnRH hippocampique dans la plasticité synaptique *via* la modulation de la synthèse locale d'œstradiol (voir § III / 3.2.2 ; Prange-Kiel *et al.*, 2008).

Actuellement, de nouvelles informations s'accumulent rapidement concernant l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse ou encore de la LH et de son récepteur dans le cerveau, et plus particulièrement dans l'hippocampe. De nombreuses études sont focalisées sur la période du vieillissement et concernent essentiellement les mécanismes qui sous-tendent le développement de la maladie d'Alzheimer, compte tenu de l'intérêt thérapeutique majeur que représente la compréhension de cette pathologie. Dans ce contexte, il serait intéressant d'établir le statut d'expression du RGnRH dans l'hippocampe âgé, et d'évaluer ses implications éventuelles dans les processus physiologiques et/ou pathologiques de vieillissement cérébral. Tous les aspects relatifs à l'étude de l'expression hippocampique du *Rgnrh* sont développés dans le § 2.1 de la partie « VI-Discussion ».



## GnRH Receptor Gene Expression in the Developing Rat Hippocampus: Transcriptional Regulation and Potential Roles in Neuronal Plasticity

Anne-Laure Schang, Valérie Ngô-Muller, Christian Bleux, Anne Granger, Marie-Claude Chenut, Catherine Loudes, Solange Magre, Raymond Counis, Joëlle Cohen-Tannoudji, and Jean-Noël Laverrière

Université Paris-Diderot Paris 7, Equipe d'Accueil Conventionnée Centre National de la Recherche Scientifique 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 75205 Paris cedex 13, France

In the pituitary of mammals, the GnRH receptor (GnRHR) plays a primary role in the control of reproductive function. It is further expressed in the hippocampus, where its function, however, is not well defined. By quantitative RT-PCR analyses, we demonstrate herein that the onset of GnRHR gene (*Gnrhr*) expression in the rat hippocampus was unexpectedly delayed as compared to the pituitary and only occurred after birth. Using a previously described transgenic mouse model bearing the human placental alkaline phosphatase reporter gene under the control of the rat *Gnrhr* promoter, we established a positive correlation between the temporal pattern of *Gnrhr* mRNA levels and promoter activity in the hippocampal formation. The gradual appearance of human placental alkaline phosphatase transgene expression occurred simultaneously in the hippocampus and interconnected structures such as the lateral septum and the amygdala, coinciding with the establishment of hippocampo-septal projections. Analysis of transcription factors together with transient transfection assays in hippocampal neurons indicated that the combinatorial code governing the hippocampus-specific expression of the *Gnrhr* is distinct from the pituitary, likely involving transactivating factors such as NUR77, cyclic AMP response element binding protein, and Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma virus oncogene homolog. A silencing transcription factor acting *via* the -3255/-1135 promoter region of the *Gnrhr* may be responsible for the transcriptional repression observed around birth. Finally, GnRH directly stimulated *via* activation of its receptor the expression of several marker genes of neuronal plasticity such as *Egr1*, *synaptophysin*, and *spinophilin* in hippocampal primary cultures, suggesting a role for GnRHR in neuronal plasticity. Further characterization of these mechanisms may help unravel important functions of GnRH/GnRHR signaling in the brain. (*Endocrinology* 152: 0000–0000, 2011)

**D**iverse forms of GnRH are present in a wide range of metazoans from mollusks to primates and play predominant roles in the control of reproductive function. In mammals, hypothalamic type 1 GnRH acts on the pituitary by interacting with its receptor (GnRHR) present at the surface of gonadotrope cells. Activation of GnRHR leads to increased synthesis and release of the gonadotro-

pins LH and FSH which, in turn, promote folliculogenesis, ovulation, spermatogenesis, and steroidogenesis (1). Besides, several studies have shown that the GnRHR gene (*Gnrhr*) is further expressed in the gonads (2–4) as well as in several other tissues including the spinal cord, endometrium, human placenta, lymphocytes, breast, and prostate (5–8). However, the most documented site of *Gnrhr* ex-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2010-0840 Received July 23, 2010. Accepted November 5, 2010.

Abbreviations: AP-1, Activator protein 1; CREB, cyclic AMP response element binding protein; CSF, cerebrospinal fluid; DAPI, 4', cis-diamidino-2-phenylindol; E, embryonic day; FOS, Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma virus oncogene homolog; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GnRHR, GnRH receptor; GRAS, GnRHR activating sequence; *hPLAP*, human placental alkaline phosphatase reporter gene; OTX1 (or 2), *Drosophila* orthodenticle homolog 1 (or 2); P, postnatal day; REST, (RE1-silencing transcription factor; SF-1, steroidogenic factor 1.

pression outside the pituitary is undoubtedly the brain and more precisely the hippocampus and other related limbic structures such as the amygdala. The presence of GnRHR in the brain has indeed been reported by different investigators using complementary approaches, namely *in situ* hybridization and ligand binding assays (9–11).

Proper regulation of the reproductive function closely depends on a correct targeting of GnRHR expression in the gonadotrope cells among the six endocrine cell-types that constitute the anterior pituitary. To gain further insights into the mechanisms regulating *Gnrhr* expression, several models of transgenic mice expressing *Gnrhr* promoter of different species have been developed (12–14). Given our interest in the regulation of rat reproductive function, we have created a transgenic mouse model that expresses the human placental alkaline phosphatase reporter gene (*hPLAP*) under the control of the 3.3-kb rat *Gnrhr* promoter, thereafter referred to as *Gnrhr-hPLAP*. Importantly, we have demonstrated that the transgene in the adult animal is specifically expressed in the gonadotropes of the anterior pituitary (15). Using this model together with *in vitro* approaches, we have contributed to decipher the combinatorial code that directs gonadotrope-specific expression of the *Gnrhr* (16), by identifying key factors in the rat (17–19). This transcription code involves ubiquitous factors such as cyclic AMP response element binding protein (CREB) and activator protein 1 (AP-1) as well as tissue-specific combination including steroidogenic factor 1 (SF-1) and LIM homeodomain proteins ISL-1 and LHX3 (19). These factors probably play an important role in the onset of *Gnrhr* expression that occurs around embryonic day (E) 13.5 in the developing pituitary (15, 19). Interestingly, in our transgenic mouse model, the 3.3-kb promoter directs transgene expression not only in pituitary gonadotrope cells but also in the hippocampal formation including the Ammon's horn and the fimbria, the lateral septum, and the amygdala (15).

Around birth, these brain areas undergo important developmental events with the establishment of the septo-hippocampal and hippocampo-septal projections. In particular, pyramidal cells of the CA1 and CA3 regions project to the lateral septum according to a topographic map delineated during late embryonic and early postnatal development (20). Reciprocally, cells within the median septum project to the hippocampus as early as E18 (21). All these events involve dramatic modulation of neuronal plasticity. In this context, several neuropeptides have been implicated in learning and memory processes as well as in hippocampal plasticity (22). However the potential roles of GnRH in these limbic structures and underlying mechanisms remain largely undefined, contrasting with the well-established presence of its receptor in the Ammon's

horn in the adult animal. Furthermore, the ontogenesis of brain GnRHR and the mechanisms involved in hippocampus-specific *Gnrhr* expression remain unknown. Accumulating evidence indicates that sexual steroids regulate neuronal plasticity in various brain regions including the hippocampus (23, 24). In particular, several studies have highlighted the role of local estrogens in estrus cycle-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus (25). Estrogens have notably been shown to up-regulate pre-synaptic or postsynaptic markers such as synaptophysin and spinophilin, respectively. Interestingly, the GnRHR has been recently implicated in the regulation of hippocampal aromatase activity and local estrogen synthesis (26), indicating that the GnRH/GnRHR signaling system may participate to mechanisms underlying neuronal plasticity.

To increase our current knowledge on GnRHR functions in the brain, we have analyzed the spatial and temporal emergence of *Gnrhr* in the hippocampus and in related structures during brain postnatal development using real-time PCR combined with the analysis of the mouse transgenic model expressing *Gnrhr-hPLAP*. We have then performed transfection assays on primary cultures of hippocampal cells to decipher the combinatorial code of transcription factors involved in *Gnrhr* promoter activation and determine whether this code differs from the pituitary code. Finally, we studied the regulation by GnRH of several marker genes of neuronal plasticity to identify potential target genes of the brain GnRH/GnRHR signaling system.

## Materials and Methods

Animals were housed and maintained according to published European communities guidelines and with approval from the experimental animal committee of the Paris Rive Gauche site (Agreement A75-13-17, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 7 University, Paris, France). Transgenic mice were generated as previously described (15). Three transgenic mouse strains obtained were numbered 1, 7, and 17. The *Gnrhr-hPLAP* transgene was integrated as a single copy gene in the strain 1 used in this study.

## Histochemistry and immunocytochemistry

Mouse heads or dissected brains from male *homozygous* B6/CBA 3.3 kb *Gnrhr-hPLAP* transgenic mice (two to three animals for each age group) were fixed in 4% paraformaldehyde. Tissue samples were then processed according to previously described procedures (15, 19). After two washes with PBS, the samples were successively incubated in 12, 15, and 18% sucrose in PBS at 4 °C for 24 h each, and then frozen at –60 °C. Sixteen-micrometer cryostat sections of brains were mounted onto slides, heated at 65 °C to inhibit endogenous phosphatases, and incubated with a mixture of chromogenic enzyme substrate contain-

ing nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate in the appropriate buffer. To visualize nuclei, 4', cis-diamidino-2-phenylindol (DAPI) staining was used as a counterstain. Detection of neurons and astrocytes was performed using monoclonal anti-NeuN MAB377 (Chemicon/Millipore, Molsheim, France) (27) and polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) Z0334 (Dako-France, Trappes, France), respectively, at 1/100 dilution for each antibody then revealed with Alexa488- or Alexa568-conjugated secondary antibody before hPLAP staining (19). In the absence of primary antibody, no specific fluorescent staining was observed.

### Hippocampal cell cultures, transfection assays, and pharmacological treatments

*Gnrhr* promoter luciferase fusion constructs were previously described (17–19). Hippocampi were dissected from brains of Sprague-Dawley male rats of E18, P (postnatal day) 0 or P4. The size of the dissected hippocampi varied from approximately 5 mm at E18 to 20 mm at P21. Each hippocampus was dissected and cells were dissociated and cultured as described (28, 29). Hippocampal neurons were transfected at day *in vitro* 3 with the appropriate rat *Gnrhr* promoter luciferase fusion constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Promoter activity was determined 48 h after transfection using the dual luciferase assay (Promega, Charbonnières, France). Expression was systematically calculated as the ratio between firefly luciferase activity driven by the different *Gnrhr* promoter constructs and the Renilla luciferase driven by the thymidine kinase promoter or the early SV40 enhancer/promoter region to normalize data for transfection efficiency. To assess the tissue specificity of the *Gnrhr* promoter, hippocampal primary culture cells were seeded onto slide flasks, cultured, and transfected with the 3.3-kb *Gnrhr*-hPLAP vector as described above. After transfection experiments, cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min and then processed as described above for revelation of hPLAP expression and immunocytochemistry using anti-NeuN and anti-GFAP antibodies. For pharmacological treatments, hippocampi were dissected from P4-P6 Sprague Dawley male rats, dissociated, and cultured as for transfection assays. At day *in vitro* 4, 100 ng/ml arachidonic acid and 50 ng/ml docosahexaenoic acid were added to the medium. Cells were treated with the GnRH agonist triptorelin (10 nM) (Sigma-Aldrich

Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h, 6 h, 24 h, or 48 h and collected at day *in vitro* 6 or 9. The GnRH antagonist antide (Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) was used as a competitor (10  $\mu$ M) simultaneously to triptorelin for a 24 h treatment. Because data from P4 or P6 cultures appeared strongly similar, they were pooled together to proceed to statistical analysis (3 to 6 independent experiments for each condition).

### RNA preparation and RT

Brain tissues of Sprague-Dawley rats were dissected as described (29), and total RNA was isolated either using Tri Reagent (Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) for 5-week-old animals or with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France) for younger rats (0–27 d) and hippocampal cells. First-strand cDNA from 0.25 to 1  $\mu$ g RNA of each sample was synthesized by RT using oligo dT primers and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions.

### RT-PCR and RT-QPCR analyses

Classical PCR amplifications were performed on cDNA samples obtained from 5-week-old rats in a final volume of 20  $\mu$ l, with 0.4  $\mu$ l cDNA solution using a Bio-Rad C1000 thermal cycler. Real-time quantifications were performed in the LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) using the SYBR green dye. PCR mixtures (12  $\mu$ l final volume) contained 6  $\mu$ l of LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics), 5  $\mu$ l of a 1/25 to 1/50 cDNA dilution, and 0.5  $\mu$ M of each primer. The cycling conditions included an initial heat-denaturing step at 95 C for 10 min, 40 cycles at 95 C for 10 s, annealing at 60 C for 10 s, and product elongation and signal acquisition at 72 C for 10 s, followed by melting curves determination. Expression levels were normalized to *Hprt* expression, which was used as an internal control gene. The real-time PCR data were analyzed using the advanced-E-method with standard-curve derived efficiencies obtained from LightCycler 480 software. The oligonucleotide primer sequences used are indicated in Table 1.

### Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA. If the F test was significant, then means were compared using Tukey-Kramer's method of multiple comparisons.

**TABLE 1.** Sequences of primer pairs designed to detect mRNA coding for GnRH, GnRHR, and transcription factors

Target cDNA	Amplicon size	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	NCBI accession number
<i>Gnrhr</i>	246 bp	TCAGCTGCCTGTTTCATCATC	AACATTTCCGGATCAAACCA	NM_031038
<i>Creb</i>	132 bp	GGTGCCAAGGATTGAAGAAG	ATTGCTCCTCCCTGGGTAAT	NM_134443
<i>cFos</i>	129 bp	GGGAGTGTTGAAGACCATGT	GCTGCAGCCATCTTATTCTT	NM_022197
<i>Nur77</i>	194 bp	TGTTGCTAGAGTCCGCCTTT	AGGAACATCAACACCCAAGC	NM_024388
<i>Sf-1</i>	187 bp	TTACACGTGCACCGAGAGTC	TGCTTTCTTCTGCTGCTTCA	NM_001191099
<i>Isl-1</i>	207 bp	AGTCCGAGAGACATGATGG	ATCTGGGAGCTGAGAGGACA	NM_017339
<i>Lhx3</i>	213 bp	AGTCCGACAAGGACAGCATC	GCAGCTCTCGAACTGCTCT	XM_001059910
<i>Prop1</i>	153 bp	GACAGCTGGAGTCAGCCTTT	GGAGTAGTGACCGCTCTTGC	NM_153627
<i>Otx1</i>	177 bp	ACCTCAAACAACCCCATAC	GGTAGCGAGTCTTTGCGAAC	NM_013109
<i>Otx2</i>	250 bp	GCACAACCTGACGTTCTGGA	ACTGGCCACTTGTTCCACTC	NM_001100566
<i>Egr1</i>	110 bp	AGCAGCGCTTTCAATCTCTCA	GTCTCCACCAGCGCCTTCTC	NM_012551
<i>Synaptophysin</i>	146 bp	GACTATGGGCAGCAAGGCTA	GATATGGGGATGGGAAAAGG	NM_012664
<i>Spinophilin</i>	233 bp	GCCATCGAGGTGTTTGAAC	TCCATCCGCTCCTTATTCTC	NM_053474

Primer pairs were designed to target cDNA fragments encompassing at least one intron in the gene sequence to prevent amplification of genomic DNA. The sizes of amplified products are indicated.

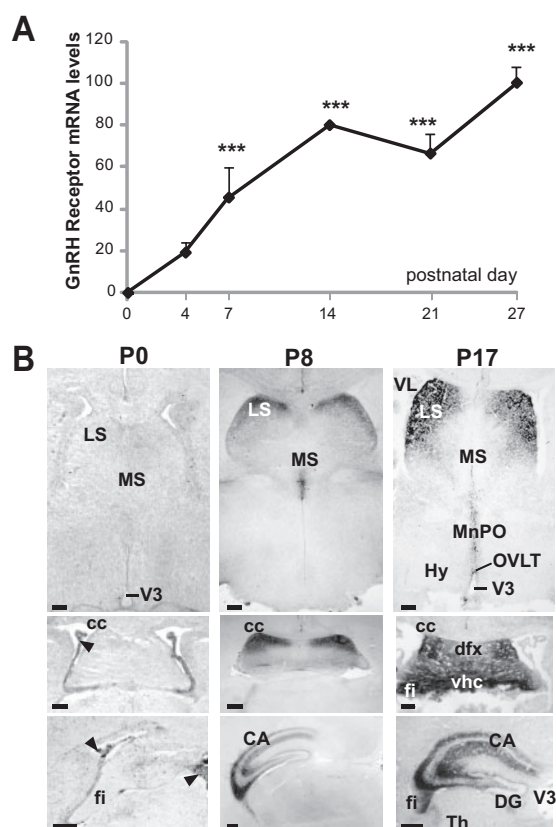
## Results

### Expression of *Gnrhr* occurs during postnatal development in the rat hippocampus

To determine the temporal pattern of *Gnrhr* expression in the hippocampus, total mRNA were isolated from dissected rat hippocampi and *Gnrhr* mRNA levels were evaluated by quantitative RT-PCR during the postnatal period, ranging from birth (P0) to P27 (Fig. 1A). In contrast to all subsequent stages, *Gnrhr* mRNA was not detected at P0. Levels of mRNA were then strongly increased during postnatal development, with a fourfold increase between P4 and P14. The mRNA levels thereafter plateaued until P27 (Fig. 1A) and slightly declined at P60 (not illustrated).

### Transgene expression correlates with *Gnrhr* expression in the hippocampo-septal system

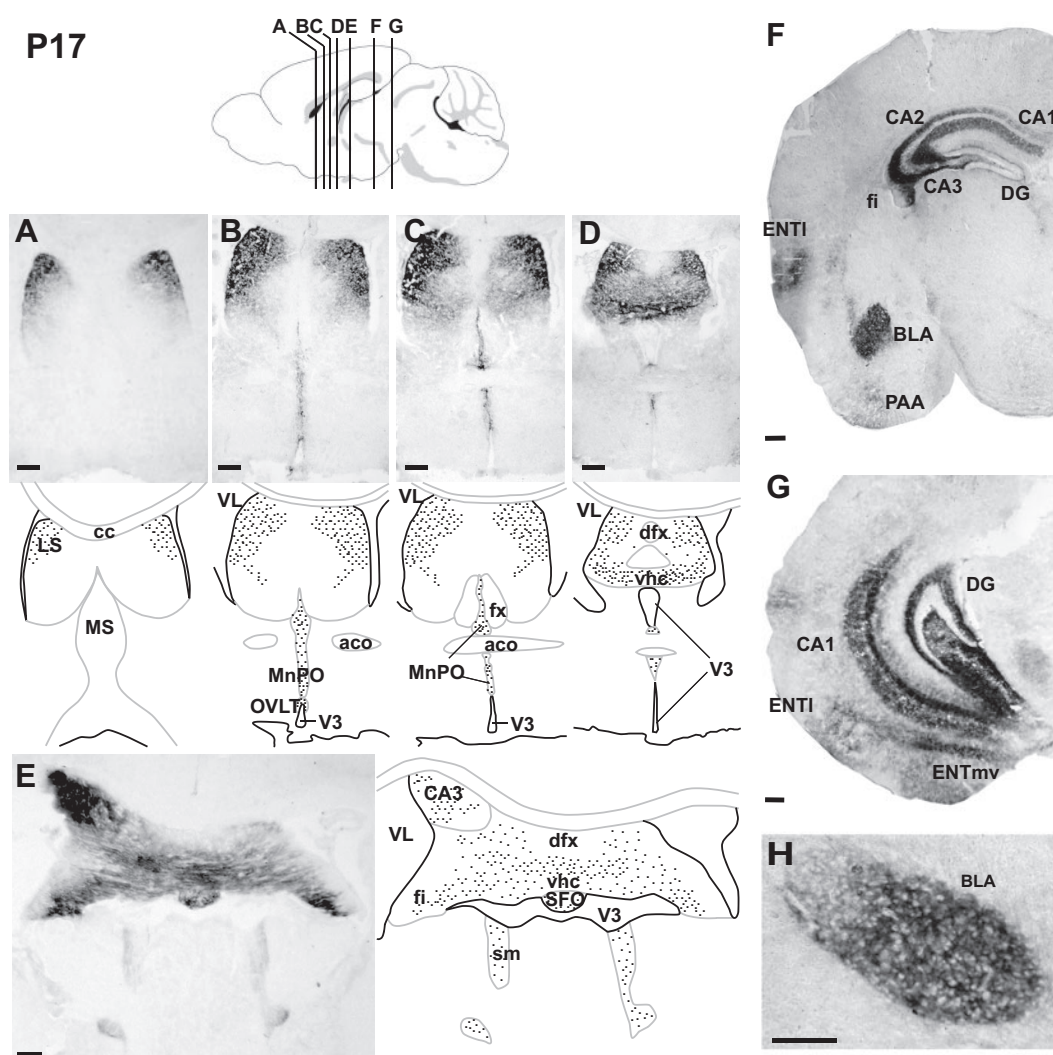
The transgenic mouse model expressing the hPLAP under the control of the rat *Gnrhr* promoter was then analyzed to compare transgene emergence with *Gnrhr* expression as determined by Q-PCR. Contrasting with pituitary expression that could be detected as early as E13.5 (15), transgene expression in the hippocampus only started after birth, and was detected around P8 with a major increase between P8 and P18 (Fig. 1B, lower panel). These data are consistent with the time-course of *Gnrhr* expression established using Q-PCR in the rat hippocampus, and this led us to investigate additional features of transgene expression in interrelated forebrain structures. Interestingly, the onset of transgene expression was coincident in the lateral septum and in the hippocampus (Fig. 1B) in agreement with our previous study in the adult animal showing a continuous staining between those two structures (15). Transgene expression was further analyzed in the periventricular zone of the hypothalamus at P17. Several stained fibers and cell bodies were detected within the vascular organ of the lamina terminalis (OVLT) and in the median preoptic nucleus contrasting with the unstained median septum (Fig. 2, A–D). Posterior to the lateral septum, fibers were intensively labeled (Fig. 2E). In addition, a faint hPLAP staining was detected within the stria medullaris. In the hippocampus, staining was detected within the Ammon's horn, especially in the strata oriens and radiatum (Fig. 2F). Robust hPLAP staining was also observed in the posterior part of the dentate gyrus (Fig. 2G). Another limbic structure, the basal amygdaloid nucleus, appeared strongly labeled (Fig. 2, F and H). The time-course of transgene expression was similar to the one reported in hippocampus, as staining was only detected at P8 and increased at P17. The lateral and medio-ventral parts of entorhinal cortex which belong to the hippocampal formation also displayed a weak staining (Fig. 2, F and G).



**FIG. 1.** Temporal onset of *Gnrhr* promoter activity in the hippocampal formation. A, Quantification of *Gnrhr* mRNA was performed by real-time RT-PCR on RNA extracted from P0 to P27 male rat hippocampi as described in *Materials and Methods*. Q-PCR data were expressed as fold over HPRT mRNA levels used as an internal control. During postnatal development, HPRT mRNA levels exhibited a moderate and gradual increase, (approximately twofold from P4 to P27), probably reflecting a developmental-associated increase in whole gene expression. Therefore, the increase in specific gene expression levels was underestimated, reinforcing the significance and specificity of the data. Results are expressed in percent of the maximum expression (P27) and are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\*,  $P < 0.001$ . B, Gradual appearance of hPLAP staining in the lateral septum and hippocampus of transgenic male mice. hPLAP activity was assayed as described in *Materials and Methods* on coronal sections of the head at P0 and of dissected brains at P8 and P17. The microphotographs were obtained under tungsten illumination. The lateral septum, the hypothalamic median preoptic nucleus (upper panels), as well as the hippocampus (lower panels) appeared unlabeled at P0 and exhibited a progressive labeling from P8 to P17. Transgene expression was also detected in intermediate structures such as the ventral hippocampal commissure (right middle panel) contrasting with unstained areas such as the medial septum. At P0, choroid plexus within the lateral ventricles appeared dark due to intrinsic refringence (arrowheads, left middle and lower panels). Scale bars, 200  $\mu$ m. See legend of Supplemental Fig. 1 for image processing. CA, Ammon's horn; cc, corpus callosum; DG, dentate gyrus; dfx, dorsal fornix; fi, fimbria; Hy, hypothalamus; LS, lateral septal nucleus; MnPO, median preoptic nucleus; MS, medial septal nucleus; OVLT, organum vasculosum of the lamina terminalis; Th, Thalamus; vhc, ventral hippocampal commissure; V3, third ventricle; VL, lateral ventricle.

Double staining with DAPI was performed to improve visualization of brain structures at higher magnification. Contrasting with median preoptic nucleus and OVLT, the transgene was not expressed in the anterior commissure





**FIG. 2.** Spatial distribution of transgene expression in the forebrain at P17. Coronal sections from dissected brains of P17 transgenic male mice were processed as described in Fig. 1 legend. The *upper panel* indicates the positions of the A to G sections. Transgene expression is illustrated in the lateral septum and median preoptic nucleus (A–D), in the hippocampal commissure and subfornical organ (E), in the hippocampus, entorhinal cortex, and basal amygdaloid nucleus (F) and in the posterior hippocampus (G). Panel H is a higher magnification of the basal amygdaloid nucleus in a slightly rostral position to the F section. Corresponding camera lucida diagrams of panels A to E are also shown. *Scale bars*, 200 μm. aco, anterior commissure, olfactory limb; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; CA, Ammon's horn; cc, corpus callosum; DG, dentate gyrus; dfx, dorsal fornix; ENTl, entorhinal cortex, lateral; ENTmv, entorhinal cortex, medioventral; fx, fornix; fi, fimbria; LS, lateral septal nucleus; MnPO, median preoptic nucleus; MS, medial septal nucleus; OVLT, organum vasculosum of the lamina terminalis; PAA, pyriform amygdaloid area; SFO, subfornical organ; sm, stria medullaris; vhc, ventral hippocampal commissure; V3, third ventricle; VL, lateral ventricle.

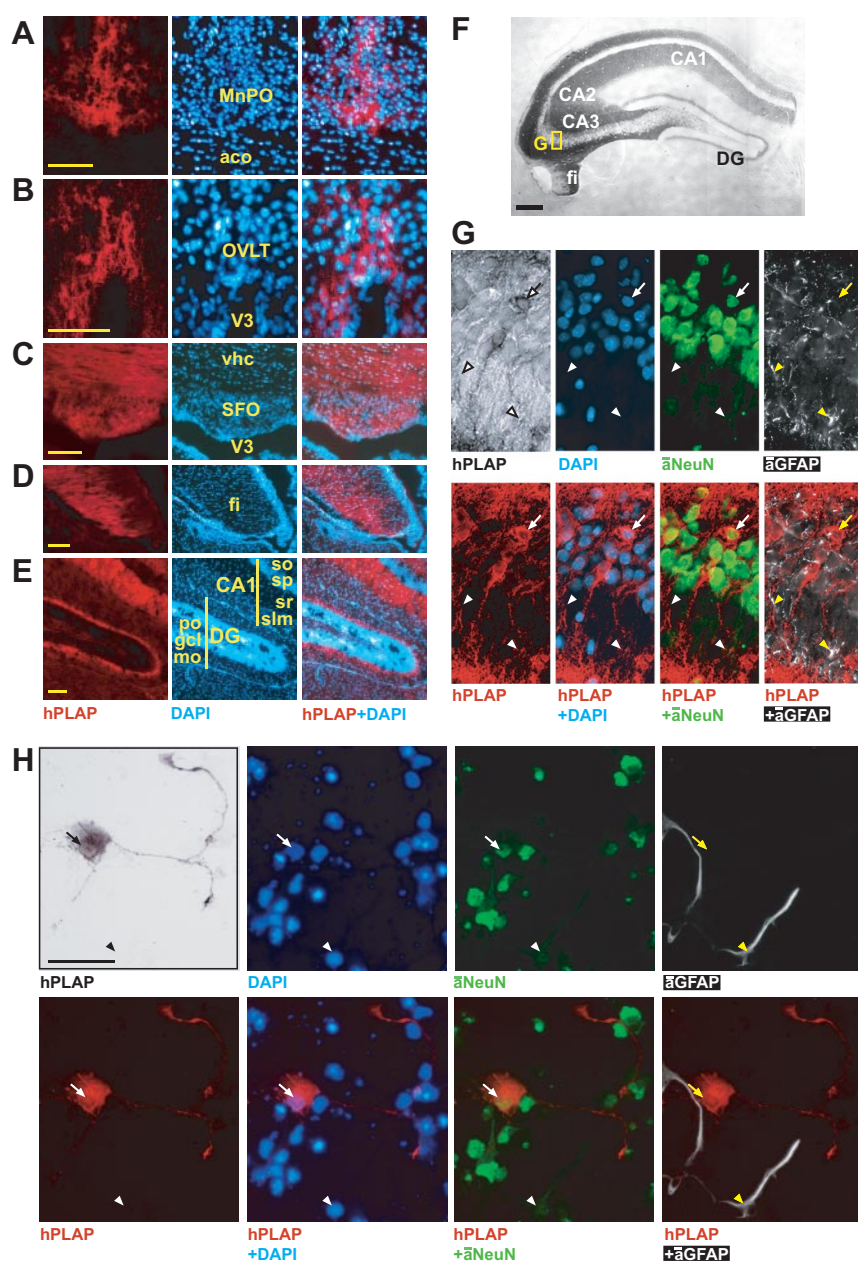
(Fig. 3, A and B). In the anterior hippocampus, fibers were strongly stained within the fimbria and the ventral hippocampal commissure, while the subfornical organ displayed some labeled cell soma (Fig. 3, C and D). More posteriorly, the faint staining within the anterior dentate gyrus was restricted to the external border of the granular zone corresponding to the outer granular cell layer (Fig. 3E). In contrast, the Ammon's horn was strongly labeled, as previously reported in the adult animal (15).

To identify the hippocampal cells expressing the transgene, antibodies directed against NeuN, a nuclear neuron-specific protein, and GFAP were applied to sections before *Gnrhr-hPLAP* detection. In the pyramidal cell layer of the hippocampus, cells that expressed cy-

toplasmic *Gnrhr-hPLAP* were also positive for nuclear NeuN (Fig. 3, F and G). In contrast, GFAP immunoreactivity remained sparse and did not colocalize with hPLAP staining. Transgene positive cells are thus likely post-mitotic neurons and not mature astrocytes. Similar results were obtained in the amygdala and posterior dentate gyrus (not illustrated).

#### The hippocampus-specific transcription code of the rat *Gnrhr* promoter is distinct from the pituitary-specific code

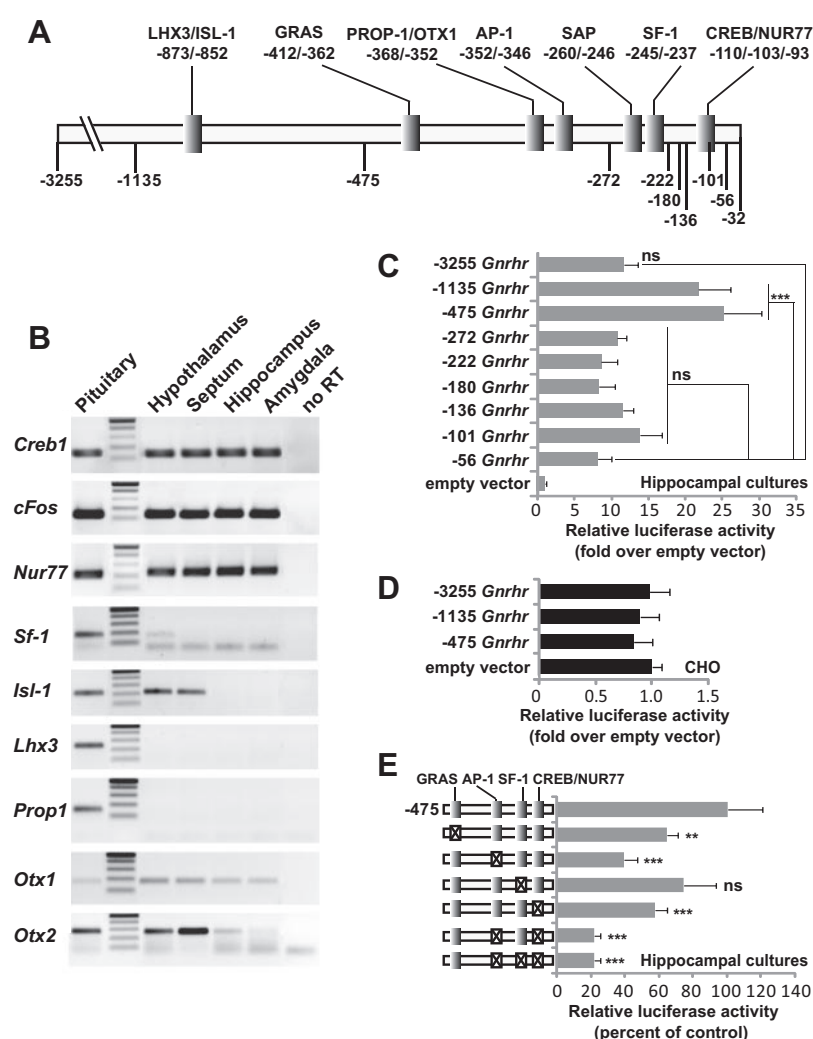
In the pituitary, *Gnrhr* expression is regulated by a combination of distinct transcription factors that interact with specific response elements on the rat *Gnrhr* promoter



**FIG. 3.** High magnification of transgene expression in the forebrain (A–E) and colocalization with neuN protein in the Ammon's horn (F and G). Coronal sections from dissected brains of P17 transgenic male mice and histochemical stainings were processed as described in Fig. 1 legend and in *Materials and Methods*. The microphotographs were obtained under tungsten (hPLAP) or fluorescence illumination (DAPI, anti-NeuN, anti-GFAP). The purple color revealing hPLAP activity was replaced by a false red color to allow simultaneous visualization of the hPLAP with DAPI staining, antiNeuN, or anti-GFAP immunofluorescence. High magnification of the median preoptic nucleus (MnPO) (A), the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) (B), the ventral hippocampal commissure (vhc) and the subfornical organ (SFO) (C), the fimbria (fi) (D), and the hippocampus with details of the Ammon's horn (CA) and dentate gyrus (DG) layers (E). F, Low-magnification view of hPLAP staining within the hippocampus. Panel G illustrates a higher magnification of the area framed in F. Arrows indicate colocalization of cytoplasmic hPLAP expression and nuclear antiNeuN fluorescence in pyramidal cells of the Ammon's horn. Arrowheads indicate anti-GFAP immunofluorescence (rhodamine fluorescence was replaced by a false white color). Scale bars, 100 μm (A–E) or 200 μm (F). H, Revelation of hPLAP expression and anti-NeuN and anti-GFAP fluorescence in primary cultures of hippocampal cells initiated at E18 and transiently transfected with the 3.3-kb *Gnrhr*-hPLAP vector. Arrows, hPLAP-expressing neuron; arrowheads, hPLAP-negative, GFAP-positive cell. aco, anterior commissure, olfactory limb; gcl, granule cell layer; mo, molecular layer; po, polymorph layer; slm, stratum lacunosum moleculare; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; V3, third ventricle.

(Fig. 4A). To determine whether these transcription factors also contribute to *Gnrhr* activation in the brain, transient transfection assays using primary cultures of hippocampal cells were performed to identify the hippocampus-specific response elements in the *Gnrhr* promoter. First, to ascertain that the constructs were specifically expressed by hippocampal neurons, the *Gnrhr*-hPLAP construct was transfected into hippocampal primary cultures seeded onto slide flasks. The cell type expressing transgene activity was then identified using immunodetection with anti-NeuN and anti-GFAP to reveal neurons and glial cells, respectively. Results showed that transgene was only expressed in neurons and could not be detected in glial cells (Fig. 3H). This confirms the observations made within the hippocampus of transgenic mice and indicates that the 3.3-kb rat *Gnrhr* promoter directs gene expression specifically in hippocampal neurons either *in vivo* or *in vitro*.

The activity of luciferase constructs containing the wild-type or mutated versions of the promoter was then evaluated (Fig. 4, C and D) (17, 18, 19). Transfection assays revealed that the LIM homeodomain response element present in the distal part of the promoter was not involved in hippocampus-specific promoter activity. Indeed, the promoter extending from –475 to –32 was as efficient as its larger counterpart (–1135 to –32). In contrast, the –475/–272 fragment of the promoter displayed strong *cis*-activating competence because deletion of this domain led to a 57% decrease in promoter activity. This suggested that GnRHR activating sequence (GRAS), PROP-1/Drosophila orthodenticle homolog 1 (OTX1), or AP-1 response elements might be involved. No peculiar effect was observed in response to further deletions of the most proximal elements. The residual 33% promoter activity was restricted to the



**FIG. 4.** The hippocampus- and pituitary-specific transcription codes are distinct. A, Schematic diagram of the rat *Gnhr* promoter (–3255/–32) illustrating the position of the response elements characterized in gonadotrope cells. The GRAS element is inactive in the rat promoter but was nevertheless indicated, taking into account its main role in mouse promoter activity. The PROP-1/OTX1 and NUR77 response elements are currently being characterized (unpublished results). Numbering is relative to the translation start codon, the adenine considered at position +1. B, Evaluation of transcription factors mRNA levels by RT-PCR. C, Delineation of the hippocampus-specific response elements by transient transfection in primary cell cultures originating from E18 hippocampi. Transient transfection assays were performed as described in *Materials and Methods* using 5' deleted promoters of the rat *Gnhr* fused to the luciferase reporter gene. Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate and expressed as fold stimulation over the empty vector. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; ns,  $P > 0.05$ . D, Levels of *Gnhr* promoter activity in CHO cells. Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate and expressed as fold stimulation over the empty vector. E, Same as in C, except that the activity of the wild-type –475/–32 rat *Gnhr* promoter was compared with the same construct with mutations (squares with crosses) of one (GRAS, AP-1, SF-1, or CREB/NUR77), two (AP-1 and CREB/NUR77), or three (AP-1, SF-1, and CREB/NUR77) response elements, and results were expressed in percent of wild-type vector.

–56 to –32 region (Fig. 4C). Surprisingly, the largest construct containing the 3.3-kb promoter was significantly less active than the constructs containing either the 1.1- or 0.47-kb promoter. This suggests that a silencer element is present within the region extending from –3255 and –1135 bp. To assess the specificity of these assays, control experi-

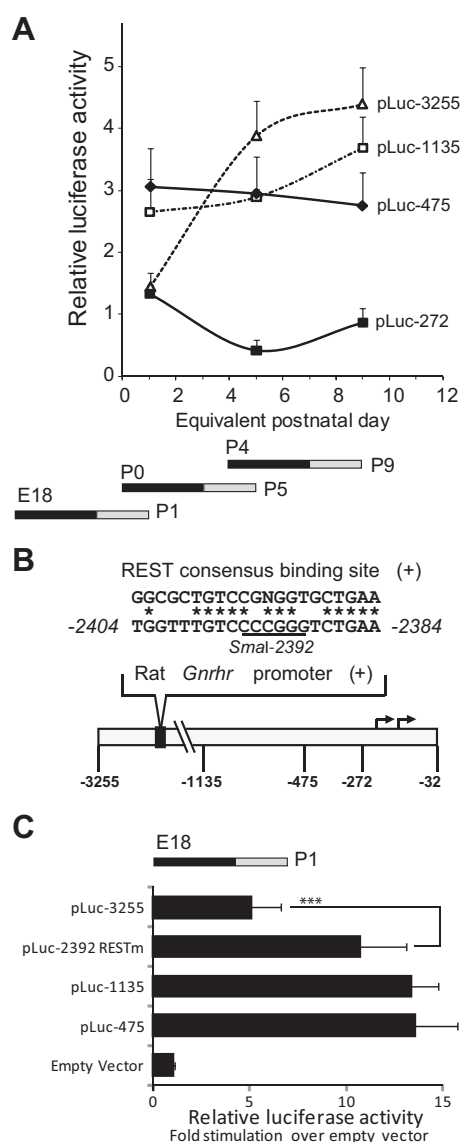
ments were performed in parallel with CHO cells, which were transfected with the *Gnhr* promoter constructs. As expected, none of these constructs displayed significant higher activity than the empty vector (Fig. 4D).

To further localize the response elements involved in hippocampus-specific promoter activity, the activity of proximal promoters (–475/–32) bearing mutations within the GRAS, AP-1, SF-1, and the overlapping CRE/NUR77 response elements was also evaluated (Fig. 4E). Only mutations affecting the GRAS, AP-1 and CRE/NUR77 elements resulted in decreased promoter activity.

We further evaluated mRNA levels of these transcription factors in relevant brain areas. Analysis of transcription factor gene expression revealed that the pituitary code consisting of LIM and paired-like homeodomain proteins as well as the nuclear receptor SF-1 is incomplete within the hippocampus (Fig. 4B), in agreement with results from transient transfection assays. Indeed, Sf-1 and Isl-1 mRNAs were both detected in the hypothalamus as expected but not in the hippocampus (30). Otx2 mRNA was present in hypothalamus and septum and detected at lower levels in the hippocampus and amygdala. In contrast, mRNA encoding OTX1, CREB, c Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma virus oncogene homolog (cellular FOS), and NUR77 were expressed in all tissues tested. Together, this strongly suggests a major involvement of these transcription factors in the hippocampus-specific expression of the *Gnhr*.

In the experiments described above, primary cultures were derived from E18 hippocampi, and thus the promoter activity was evaluated at a period corresponding to P1 developmental stage, taking into account the additional time needed for *in vitro* culture and transient transfection (3 d + 2 d). We next wondered whether this hippocampus-specific code might evolve during later stages of development, and notably during the temporal window characterized by the onset of *Gnhr* expression *in vivo*. To evaluate this, hippocampal primary cultures were initiated at later stages of development, P0 and P4, leading to postnatal developmental day P5 and P9, respectively at the time when





**FIG. 5.** The distal promoter region (–3255/–1135) of the *Gnrhr* represses transcription in E18 hippocampal cell cultures. **A**, Comparison of *Gnrhr* promoter activities in hippocampal primary culture cells originating from E18, P0, or P4 male rats. The schematic diagram below the graph illustrates the experimental schedule: the cells cultured at E18, P0, and P4 were transfected 3 d later (black bars), and luciferase activity was measured 48 h after transfection (gray bars) at equivalent postnatal day P1, P5, and P9, respectively. Transient transfection assays were performed as described in Fig. 4C. Results are expressed as fold over pLuc-56*Gnrhr* activity and are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. **B**, Sequence alignment illustrating homologies between the –2404/–2384 region of the rat *Gnrhr* promoter and the consensus binding site for the transcriptional repressor REST. **C**, Deletion of the REST-like motif increases promoter activity in hippocampal culture initiated at E18. The new construct pLuc –2392 RESTm was obtained by deleting the *Hind* III, *Sma* I fragment of the 3.3-kb construct. The *Hind* III site is located at the 5' end of the promoter and the *Sma* I site within the REST-like motif. Deletion of the fragment thus resulted in a shorter promoter ending at –2392 and containing only half of the REST-like motif. Results are expressed as fold over the empty vector and are the mean  $\pm$  SD of three to four independent experiments performed in triplicate.

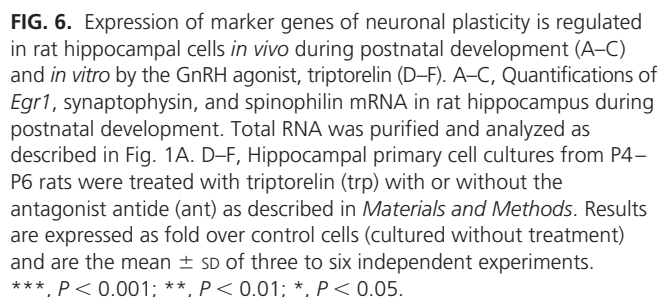
experiments were achieved (Fig. 5A). At these different stages of development, cultures were transfected either with the 3.3-kb promoter or with shorter constructs starting at positions –1135, –475, and –272. The activity of the shortest construct, containing the –272 to –32 region, displayed a low activity which remained unchanged until P9. Similar results were obtained with shorter constructs starting at –222, –180, –136, and –101 (data not shown). Larger constructs such as pLuc-1135 and pLuc-475 were highly active at P1 as previously illustrated (Fig. 4C) and remained at the same level of activity during all the postnatal period examined. In contrast, the largest construct containing the additional –3255/–1135 region behaved differently. Indeed, whereas promoter activity was low at P1, it increased dramatically at P5 and P9. This suggests that at P1, *Gnrhr* promoter activity is repressed through mechanisms that become then inoperative during later stages of the postnatal period.

Interestingly, analysis of the 3.3-kb promoter sequence revealed a short 20-bp sequence extending from –2404 to –2384 displaying a substantial homology with the consensus element that binds the transcriptional repressor REST (RE1-silencing transcription factor; also known as NRSF) known to repress neuronal gene programs (Fig. 5B) (31). The –3255/–32 promoter used *in vitro* is identical to the promoter directing transgene expression *in vivo*. Hence, these results are consistent with the temporal pattern of *Gnrhr* promoter activity reported *in vivo* using our transgenic mouse model. To assess the silencer competence of the REST-like sequence, we took advantage of a *Sma*I site within this motif to create a novel 5' deleted construct ending at –2392, which resulted in a mutated REST promoter carrying only half of motif. This construct was analyzed together with the construct carrying the 3255-bp promoter using the same experimental schedule described above at E18. Under these condition (Fig. 5C), the mutated REST promoter displayed significant higher luciferase activity ( $10.7 \pm 2.4$ -fold over empty vector) than its larger counterpart carrying the intact motif ( $5.1 \pm 1.5$ -fold). Further, the activity of the mutated construct did not exhibit any significant difference with promoters ending either at –1135 or –475 ( $13.4 \pm 1.4$  and  $13.6 \pm 2.2$ -fold, respectively). Although not strictly targeting the REST sequence, these experiments strengthened the hypothesis that the REST-like sequence behaved as a silencer within the 3.3-kb promoter.

### GnRH regulates the expression of several marker genes of neuronal plasticity in rat hippocampal primary cultures

To gain new insights into the function of the GnRH in the developing hippocampus, mRNA levels of marker genes of neuronal plasticity were evaluated by quantitative PCR during the period of appearance of *Gnrhr* ex-





The ability of GnRHR to directly modulate these marker genes was then evaluated. To this aim, primary cultures of hippocampal cells isolated from young male rat (P4–P6) were cultured from 4 to 7 d before being treated by the GnRH agonist triptorelin for 1 to 48 h. The mRNA

## Discussion

Our data are consistent with a recent study exploring GnRHR expression in the mouse and ovine brain using a novel antibody against GnRHR (35). Furthermore, they are also consistent with the reported *Gnrhr* expression in the human brain, especially in the hippocampal formation (36). The fact that the human, rat, mouse, and ovine species all express GnRHR in the hippocampus supports the idea that the GnRH/GnRHR signaling system plays important functions in this brain structure.

Gene transfer experiments from one mammalian species to another have revealed that in homologous tissues, primary DNA sequence rather than epigenetic machinery, cellular environment, or transcription factors directs species-specific transcription (37). Accordingly, the temporal correlation between mRNA levels in rat hippocampus and transgene expression in our mouse model suggests that the *Gnrhr-hPLAP* transgene is transcriptionally regulated in a rat-specific manner despite a mouse environment. This

model is therefore a reliable tool to further analyze the characteristics of rat *Gnrhr* expression and its regulation. As previously reported, transgene expression in the pituitary is restricted to the sites of GnRHR synthesis (*i.e.*, the gonadotrope cells) (15). Here we demonstrate, based on NeuN codetection performed both *in vivo* and *in vitro*, that the transgene is restricted to hippocampal postmitotic neurons and is not expressed in glial cells. Sites of hPLAP expression are consistent with previous works using autoradiographic detection of GnRHR and reporting the presence of fibers emerging from the pyramidal cell layer, the strata oriens, and radiatum (9, 10). In contrast, conflicting data were obtained using *in situ* hybridization studies, which only reported labeling of the pyramidal cell layer (11, 38). Together, this strongly suggests that GnRHR as well as hPLAP are synthesized in the pyramidal cell layer and then move along fibers of the strata oriens and radiatum. Indeed, hPLAP is likely recruited to the plasma membrane due to its glycosylphosphatidylinositol anchor and can migrate along fibers, outlining both axonal and dendritic projections (39). The robust staining observed in the lateral septum thus likely originates from hPLAP transport along the hippocampal fibers projecting to the septal areas. The coincidence of the temporal onset of hPLAP activity in both the hippocampus and lateral septum is consistent with this statement. This hippocampo-septal transport also probably occurs with the GnRHR itself, as suggested by previous works reporting the presence of GnRHR in the lateral septum based on ligand binding assay but not of the corresponding transcript using *in situ* hybridization (38). Besides, the established existence of hippocampo-septal projections provides a neuroanatomical support to this hypothesis (21, 40–42).

Most importantly, this study provides the first identification of some of the mechanisms that regulate transcriptional *Gnrhr* promoter activity in the hippocampus. In particular, it provides evidence that the hippocampus-specific transcription code actually differs from that identified in the pituitary. Obviously, from both *in vivo* and *in vitro* data reported herein, the hippocampal code does not include the LIM-homeodomain transcription factors or factors related to SF-1, which are crucial in the pituitary as they are involved in gonadotrope-specific *Gnrhr* expression in several species including rat, human, and mouse (16, 19). Only a specific combination of factors involving CREB, NUR77, and FOS appears to be implicated. The hippocampus-specific transcriptional code may probably involve additional tissue-specific factors which still require to be identified. Furthermore, our study provides evidence that silencing transcription factor(s)-related mechanisms govern the onset of hippocampal *Gnrhr* ex-

pression during postnatal development. In this context, data are accumulating indicating that release of gene repression rather than activation of gene transcription might be a general mechanism of neuronal differentiation. REST appears as a key transcriptional repressor in these regulatory mechanisms (31). The element located between –2404/–2385 in *Gnrhr* promoter displays homology with the REST consensus binding site, suggesting that REST is implicated in the repression of hippocampal *Gnrhr* expression before and around birth. Indeed, *in vitro* experiments have provided evidence that deletion of the region containing the REST-like response element leads to increased promoter activity in primary cultures at equivalent P1. The same –3255/–32 promoter used *in vitro* was also used to direct transgene expression *in vivo*. Therefore, the temporal pattern of *Gnrhr* promoter activity reported *in vivo* using the transgenic mouse model may result from REST-induced repression before and around birth followed by gradual release of repression in the postnatal period. This hypothesis, however, deserves further investigations.

The functional role of the GnRHR in the limbic system remains largely unknown. GnRHR may be associated with functions related to reproductive function, especially in the amygdala, a structure involved in sexual behavior (43). However, it may also be involved in regulation of nonreproductive function(s). Interestingly, our data demonstrate that GnRH, through activation of its receptor in primary cultures of hippocampal cells, directly stimulates the expression of several marker genes of neuronal plasticity. Further, the expression of these markers was also found to be correlated with the expression of *Gnrhr* *in vivo* in the developing hippocampus. Our data, showing a direct effect of GnRH on hippocampal cells, are in agreement with previous works reporting that GnRHR activates the protein kinase C-dependent intracellular signaling pathway and alters the electrical properties of hippocampal neurons (44). Modulation of these reported effects by castration has emphasized the important contribution of steroids in hippocampal GnRHR function. Indeed, a recent study has indicated that estradiol-mediated up-regulation of spine synapse density and spinophilin expression could be modulated by GnRHR (26). Together with these data, our results strongly suggest that the GnRH/GnRHR signaling system contributes to hippocampal postnatal development by regulating neuronal plasticity.

The intriguing question related to this work is the origin of endogenous GnRH capable to induce such effects. To activate the brain receptor, the GnRH ligand originating from the hypothalamus may be transported to the hippocampus through the cerebrospinal fluid (CSF) (45, 46).

However, recent data suggest that CSF GnRH only modulates sites close to the infundibular recess of the third ventricle (46). Moreover, CSF GnRH is not detected in the lateral ventricles. In addition, we have revealed immunoreactive GnRH after detection of hPLAP activity to determine whether GnRH might be secreted within or in the vicinity of neurons expressing the transgene (Supplemental Fig. 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>). GnRH immunofluorescent fibers were readily detected in the median eminence as expected with, however, no evidence for transgene expression (Supplemental Fig. 1A). In contrast, both GnRH and *Gnrhr* were expressed in the SFO, but cells expressing the transgene appeared intermingled and not colocalized with GnRH fibers that seem to follow an anterior–posterior axis (Supplemental Fig. 1B). Strong GnRH immunoreactivity was also detected in the ventral part of the OVLT where transgene expression was just surrounding GnRH immunoreactive neurons (Supplemental Fig. 1C). Again, there was no evidence for colocalization of the two markers. GnRH immunoreactive fibers were also present in the medial preoptic area (Supplemental Fig. 1C) as well as in the median septum (not illustrated). Together, these data suggested that GnRH in the OVLT and SFO acts through paracrine rather than autocrine mechanisms. There was no clear evidence of GnRH immunoreactivity neither in the hippocampus nor in the lateral septum. Interestingly, we have found high levels of *Gnrh* mRNA within the rat septum (unpublished data), which is in agreement with previous identification of septal GnRH neurons (47, 48). Given the fact that median septal neurons project to the CA1 and CA3 regions as well as to the dentate gyrus (49), GnRH may reach hippocampal receptors through a GnRH septo-hippocampal tract (50).

Due to their early emergence during evolution, GnRH and GnRHR are widely distributed among animal species (51, 52). Three types of GnRH and GnRHR have been characterized so far in invertebrates, agnathans, and fishes. In mammals such as human, rat, and mouse, only the type I GnRHR is conserved and may thus have acquired functions mediated by the two other types of GnRHR in lower vertebrates, especially in the nervous system. This, together with the diversity of the signaling pathways activated by type I GnRHR, suggests that GnRHR mediates a variety of functions in the mammalian brain. Our study suggests that, while acting as a neurohormone in the pituitary, GnRH may act in the hippocampus as a neuromediator involved in postnatal developmental events. The differential temporal onset of *Gnrhr* may help defining its functions in each brain structure. The fact that transcriptional activation of the *Gnrhr* in the

hippocampal formation occurs after birth and coincides with the establishment of hippocampo-septal projections supports such a view. The precise roles of GnRHR in the brain and the cellular mechanisms governing the time-dependent induction of this gene are likely interrelated, and their characterization represents an exciting challenge.

## Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Jean-Noël Laverrière, Université Paris-Diderot Paris 7, Equipe d'Accueil Conventionnée Centre National de la Recherche Scientifique 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 4 rue MA Lagroua Weill-Hallé 75205 Paris cedex 13, France. E-mail: [jean-noel.laverriere@univ-paris-diderot.fr](mailto:jean-noel.laverriere@univ-paris-diderot.fr).

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Paris 6 and Paris 7 Universities, and the Agence Nationale pour la Recherche.

Present address for A.G.: Division of Endocrinology, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania 19104. Present address for C.L.: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, 2ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

Disclosure Summary: The authors have nothing to declare.

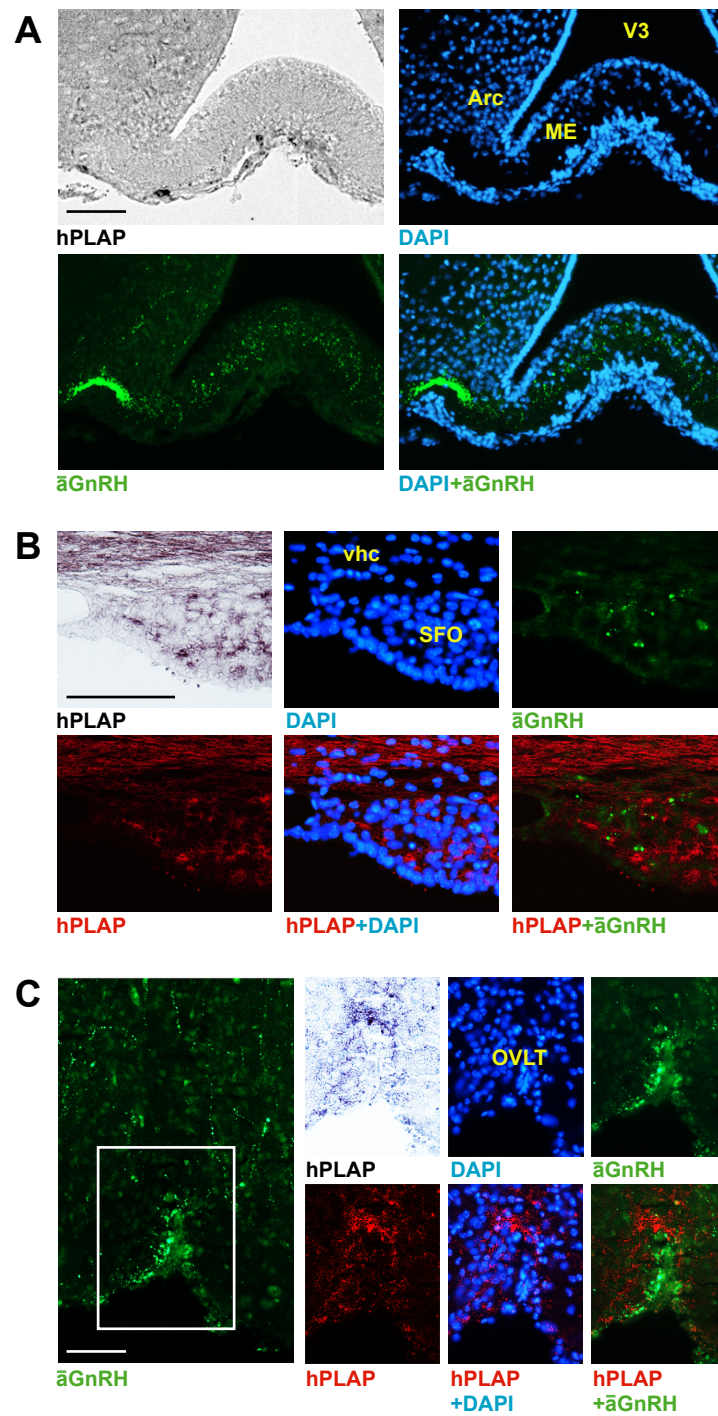
## References

1. Counis R, Garrel G, Laverrière JN, Simon V, Bleux C, Magre S, Cohen-Tannoudji J 2009 The GnRH receptor and the response of gonadotrope cells to GnRH pulse frequency code. A story of an atypical adaptation of cell function relying on a lack of receptor homologous desensitization. *Folia Histochem Cytobiol* 47:S81–S87
2. Botté MC, Chamagne AM, Carré MC, Counis R, Kottler ML 1998 Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* 159:179–189
3. Mounni M, Kottler ML, Counis R 1994 Nucleotide sequence analysis of mRNAs predicts that rat pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptor proteins have identical primary structure. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1359–1366
4. Bull P, Morales P, Huyser C, Socías T, Castellón EA 2000 Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 6:582–586
5. Quintanar JL, Salinas E, González R 2009 Gonadotropin-releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats. *Neurosci Lett* 461:21–24
6. Harrison GS, Wierman ME, Nett TM, Glode LM 2004 Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer* 11:725–748
7. Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC 1999 Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 84:743–750
8. Kottler ML, Starzec A, Carré MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R 1997 The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71:595–599



9. Leblanc P, Crumeyrolle M, Latouche J, Jordan D, Fillion G, L'Heritier A, Kordon C, Dussailant M, Rostène W, Haour F 1988 Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 48:482–488
10. Ban E, Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Leblanc P, Heurtier JF, Drieu K, Fillion G, Haour F 1990 GnRH receptors in rat brain, pituitary and testis; modulation following surgical and gonadotropin-releasing hormone agonist-induced castration. *Mol Cell Endocrinol* 26:1099–1107
11. Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM 1997 Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res* 52:475–490
12. McCue JM, Quirk CC, Nelson SE, Bowen RA, Clay CM 1997 Expression of a murine gonadotropin-releasing hormone receptor-luciferase fusion gene in transgenic mice is diminished by immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 138:3154–3160
13. Duval DL, Farris AR, Quirk CC, Nett TM, Hamernik DL, Clay CM 2000 Responsiveness of the ovine gonadotropin-releasing hormone receptor gene to estradiol and gonadotropin-releasing hormone is not detectable in vitro but is revealed in transgenic mice. *Endocrinology* 141:1001–1010
14. Wen S, Schwarz JR, Niculescu D, Dinu C, Bauer CK, Hirdes W, Boehm U 2008 Functional characterization of genetically labeled gonadotropes. *Endocrinology* 149:2701–2711
15. Granger A, Ngô-Muller V, Bleux C, Guigon C, Pincas H, Magre S, Daegelen D, Tixier-Vidal A, Counis R, Laverrière JN 2004 The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* 145:983–993
16. Hapgood JP, Sadie H, van Biljon W, Ronacher K 2005 Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol* 17:619–638
17. Pincas H, Amoyel K, Counis R, Laverrière JN 2001 Proximal cis-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:319–337
18. Pincas H, Laverrière JN, Counis R 2001 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulate the promoter activity of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene *via* a bipartite response element in gonadotrope-derived cells. *J Biol Chem* 276:23562–23571
19. Granger A, Bleux C, Kottler ML, Rhodes SJ, Counis R, Laverrière JN 2006 The LIM-homeodomain proteins Isl-1 and Lhx3 act with steroidogenic factor 1 to enhance gonadotrope-specific activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 20:2093–2108
20. Martínez A, Soriano E 2005 Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 49:211–226
21. Linke R, Pabst T, Frotscher M 1995 Development of the hippocampo-septal projection in the rat. *J Comp Neurol* 351:602–616
22. Ogren SO, Kuteeva E, Elvander-Tottie E, Hökfelt T 2010 Neuropeptides in learning and memory processes with focus on galanin. *Eur J Pharmacol* 626:9–17
23. Garcia-Segura LM 2008 Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20:705–712
24. Parducz A, Hajsan T, Macluskus NJ, Hoyk Z, Csakvari E, Kurunczi A, Prange-Kiel J, Leranth C 2006 Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience* 138:977–985
25. Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Jarry H, Rune GM 2009 Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm* 116:1417–1425
26. Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM 2008 Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density *via* its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180:417–426
27. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM 1992 NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211
28. Lelouvier B, Tamagno G, Kaindl AM, Roland A, Lelievre V, Le Verche V, Loudes C, Gressens P, Faivre-Baumann A, Lenkei Z, Dournaud P 2008 Dynamics of somatostatin type 2A receptor cargoes in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 28:4336–4349
29. Zapala MA, Hovatta I, Ellison JA, Wodicka L, Del Rio JA, Tennant R, Tynan W, Broide RS, Helton R, Stoveken BS, Winrow C, Lockhart DJ, Reilly JF, Young WG, Bloom FE, Lockhart DJ, Barlow C 2005 Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10357–10362
30. Davis AM, Seney ML, Stallings NR, Zhao L, Parker KL, Tobet SA 2004 Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurobiol* 60:424–436
31. Hirabayashi Y, Gotoh Y 2010 Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci* 11:377–388
32. Knapka E, Kaczmarek L 2004 A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol* 74:183–211
33. Prange-Kiel J, Rune GM 2006 Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138:765–772
34. Allen PB, Ouimet CC, Greengard P 1997 Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9956–9961
35. Albertson AJ, Navratil A, Mignot M, Dufourny L, Cherrington B, Skinner DC 2008 Immunoreactive GnRH type I receptors in the mouse and sheep brain. *J Chem Neuroanat* 35:326–333
36. Wilson AC, Salamat MS, Haas RJ, Roche KM, Karande A, Meethal SV, Terasawa E, Bowen RL, Atwood CS 2006 Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *J Endocrinol* 191:651–663
37. Wilson MD, Barbosa-Morais NL, Schmidt D, Conboy CM, Vanes L, Tybulewicz VL, Fisher EM, Tavaré S, Odom DT 2008 Species-specific transcription in mice carrying human chromosome 21. *Science* 322:434–438
38. Jennes L, Woolums S 1994 Localization of gonadotropin releasing hormone receptor mRNA in rat brain. *Endocrine* 2:521–528
39. Badaloni A, Bonanomi D, Albieri I, Givogri I, Bongarzone E, Valtorta F, Consalez GG 2007 Transgenic mice expressing a dual, CRE-inducible reporter for the analysis of axon guidance and synaptogenesis. *Genesis* 45:405–412
40. Alonso A, Köhler C 1982 Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett* 31:209–214
41. Gao PP, Zhang JH, Yokoyama M, Racey B, Dreyfus CF, Black IB, Zhou R 1996 Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocampo-septal system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11161–11166
42. Yue Y, Chen ZY, Gale NW, Blair-Flynn J, Hu TJ, Yue X, Cooper M, Crockett DP, Yancopoulos GD, Tessarollo L, Zhou R 2002 Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10777–10782
43. Rajendren G, Moss RL 1993 The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res* 617:81–86
44. Skinner DC, Albertson AJ, Navratil A, Smith A, Mignot M, Talbott H, Scanlan-Blake N 2009 Effects of gonadotrophin-releasing hormone outside the hypothalamic-pituitary-reproductive axis. *J Neuroendocrinol* 21:282–292

45. Skinner DC, Malpaux B, Delaleu B, Caraty A 1995 Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology* 136:3230–3237
46. Caraty A, Skinner DC 2008 Gonadotropin-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid: endogenous distribution and exogenous uptake. *Endocrinology* 149:5227–5234
47. Skynner MJ, Slater R, Sim JA, Allen ND, Herbison AE 1999 Promoter transgenics reveal multiple gonadotropin-releasing hormone-I-expressing cell populations of different embryological origin in mouse brain. *J Neurosci* 19:5955–5966
48. Spergel DJ, Krüth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH 1999 GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19:2037–2050
49. Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E 2005 Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 58:151–164
50. Jennes L, Stumpf WE 1980 LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 209:239–256
51. Gorbman A, Sower SA 2003 Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. *Gen Comp Endocrinol* 134:207–213
52. Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ 2007 GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153:346–364



Supplemental figure 1

### **Supplemental figure 1**

Heads from male mice expressing 3.3 kb rat Gnhr promoter-hPLAP were fixed in 4% paraformaldehyde. Mouse heads were dehydrated in alcohol and toluene, embedded in paraffin wax, sectioned at 10  $\mu$ m thickness, mounted onto slides and rehydrated. The sections were immunostained using anti-GnRH antibody at 1/1000 dilution for 72 h at 4 C (gift from Dr. Y Tillet, Nouzilly, France), revealed with Alexa488-conjugated secondary antibody and finally treated to reveal hPLAP expression as described in Materials and Methods. Images were captured using a Nikon Eclipse 90i microscope with 10x/0.30, 20x/0.50 or 40x/0.75 objectives. Intensity and contrast of the final images were adjusted in Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated). A, GnRH immunoreactive nerve terminals at the median eminence (ME), B, GnRH-positive fibers in the SFO, which do not co-localize with the hPLAP staining, C, GnRH-positive fibers surrounded by hPLAP staining in the OVLT with further GnRH-positive fibers extending through the preoptic area. Bars: 100  $\mu$ m. Abbreviation: Arc, Arcuate nucleus.

### **3. Article 3 : Identification and analysis of two novel sites of rat GnRH receptor gene promoter activity: the retina and pineal gland.**

*Soumis pour publication*

**Anne-Laure Schang, Valérie Ngô-Muller, Marie-Claude Chenut, Christian Bleux, Jean-Claude Jeanny, Raymond Counis, Joelle Cohen-Tannoudji, Jean-Noël Laverrière.**

---

Si l'hippocampe constitue un site bien caractérisé de l'expression du *Rgnrh*, le transgène *Rgnrh-hPLAP* a également permis d'étudier des sites plus inattendus d'activité du promoteur du *Rgnrh*. Au cours de cette étude, nous avons pu observer une expression du transgène dans deux organes structurellement et fonctionnellement apparentés, la rétine et la glande pinéale. Nous avons décrit en détail l'expression spatio-temporelle de cette expression au cours du développement, et ainsi établi que le promoteur du *Rgnrh* est activé très précocement dans la glande pinéale dès E13,5, tandis que cette activité est différée dans la rétine et n'est visible qu'à E17,5. Chez l'adulte, cette expression tend à diminuer dans la rétine mais reste élevée dans la glande pinéale. En outre, nous avons mis en évidence l'expression du *Rgnrh* endogène dans ces tissus chez le rat par RT-PCR, indiquant que l'expression du transgène est, une fois encore, corrélée avec l'expression du gène endogène. Parmi les facteurs de transcription communs à la rétine et à la glande pinéale, le facteur Paire-like OTX2 est également exprimé dans l'hypophyse. De façon surprenante, nous avons observé que le *Rgnrh* n'est pas sensible à OTX2 seul, mais que ce facteur est capable d'agir en synergie avec un partenaire bien spécifique en fonction du type cellulaire. En effet, dans la lignée gonadotrope  $\alpha$ T3-1, OTX2 est efficace en association avec un autre facteur Paired-like à homéodomaine, PROP1. Dans un contexte non gonadotrope, la lignée CHO, c'est avec le facteur CREB qu'OTX2 est fonctionnellement associé pour stimuler le promoteur du *Rgnrh*. En outre, l'élément cis-activateur impliqué dans l'effet activateur d'OTX2 est différent en fonction du contexte cellulaire et donc du partenaire en jeu. Les observations réalisées dans les cellules CHO pourraient refléter les conditions d'activation du transgène dans la glande pinéale et la rétine, où les facteurs CREB et OTX2 sont tous deux exprimés contrairement à PROP1.

Chez les Mammifères, la rétine et la glande pinéale participent conjointement à la synchronisation des rythmes biologiques au sein du système photoneuroendocrine. L'influence de ces rythmes sur la fonction de reproduction a été caractérisée de façon extensive, mais peu d'études se sont intéressées au phénomène réciproque (Itoh *et al.*, 2003, Simonneaux et Ribelayga, 2003). En suggérant la présence du RGnRH dans ces deux tissus par l'observation de l'activation du gène du récepteur, notre étude ouvre des perspectives intéressantes dans ce domaine, qui seront discutées dans le § 2.2 de la partie « VI-Discussion ».



## **Identification and analysis of two novel sites of rat GnRH receptor gene promoter activity: the retina and pineal gland.**

Anne-Laure Schang, Christian Bleux, Marie-Claude Chenut, Valérie Ngô-Muller, Jean-Claude Jeanny<sup>1</sup>,  
Raymond Counis, Joëlle Cohen-Tannoudji, Jean-Noël Laverrière.

*Université Paris Diderot Paris 7, EAC CNRS 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 4 rue MA Lagroua Weill-Hallé 75205 Paris cedex 13, France.*

<sup>1</sup>*INSERM UMRS 872 Team 17, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75006, France*

**Short title:** *Gnrhr* expression in pineal gland and retina

**Key words:** GnRH receptor, pineal gland, retina, transcription factors, transgenesis, hPLAP.

### **To whom correspondence, proofs, and requests for reprints should be addressed:**

Dr Jean-Noël Laverrière, Université Paris Diderot Paris 7, EAC CNRS 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'axe gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 4 rue MA Lagroua Weill-Hallé 75205 Paris cedex 13, France.

Tel: 33 1 57 27 84 06

Fax: 33 1 57 27 84 14

[jean-noel.laverriere@univ-paris-diderot.fr](mailto:jean-noel.laverriere@univ-paris-diderot.fr)

**Abstract**

In mammals, activation of pituitary GnRH receptor (GnRHR) by hypothalamic GnRH increases the synthesis and secretion of LH and FSH, which, in turn, regulate gonadal functions. However, GnRHR gene (*Gnrhr*) expression is far to be restricted to the pituitary. To gain new insights into this issue, we have created a transgenic mouse model that expresses the human placental alkaline phosphatase reporter gene driven by the rat *Gnrhr* promoter. Using this model, we demonstrated that *Gnrhr* promoter is active not only in pituitary gonadotrope cells but also in several extra-pituitary sites. In this study, we show that rat *Gnrhr* promoter is operative in two functionally related organs, the pineal gland, as early as embryonic day (E) 13.5, and the retina where activity was only detected at E17.5. Accordingly, *Gnrhr* mRNA was expressed by both tissues. We further detected transcription factors known to regulate *Gnrhr* promoter activity such as the LIM homeodomain factors LHX3 and ISL1 in the retina. Most importantly, we show, by transient transfection studies in CHO cells, that OTX2, a major transcription factor presiding to both pineal and retina cell differentiation is able to activate *Gnrhr* promoter together with an unsuspected partner, CREB, through a newly characterized response element. Specific associations of transcription factors activating distinct response elements along the promoter may thus explain how *Gnrhr* expression can be directed to diverse and nevertheless specific cell lineages. These data open new avenues regarding GnRH-mediated control of seasonal and circadian rhythms in reproductive physiology.

## Introduction

In mammals, the neuroendocrine control of reproduction is mediated by the secretion of hypothalamic GnRH, which activates its receptor (GnRHR) located on pituitary gonadotrope cells. Activation of GnRHR leads to synthesis and secretion of the gonadotropin hormones LH and FSH, which, in turn, regulate gonadal steroidogenesis and gametogenesis. In addition to pituitary, *Gnrhr* is known to be expressed in different areas of the central nervous system as well as in gonads in rodents [1, 2, 3, 4, 5, 6]. It is also expressed in several other tissues including the endometrium, human placenta, lymphocytes, breast, and prostate [7, 8, 9]. To analyze the mechanisms regulating *Gnrhr* expression, we have created a transgenic mouse model expressing the human placental alkaline phosphatase reporter gene under the control of the 3.3 kb promoter of the rat *Gnrhr*, thereafter referred to as *Gnrhr-hPLAP*. Importantly and in agreement with the reported extra-pituitary expression of endogenous *Gnrhr*, we have demonstrated that transgene expression is not restricted to gonadotrope cells in the adult pituitary but also coincides with other known sites of *Gnrhr* expression such as the Ammon's horn and the fimbria in the hippocampus, the lateral septum and the amygdala. This indicates that a unique promoter is able to direct *Gnrhr* expression in multiple and nevertheless specific brain areas [10]. Recently, we have extended the analysis of *Gnrhr* expression to embryonic and postnatal developmental stages in extra-pituitary sites, including notably the limbic system, in order to improve our knowledge about the temporal onset and time-course of *Gnrhr* promoter activity [11, 12]. This led to the discovery of novel expression sites raising the question of the transcription mechanisms that direct *Gnrhr* expression in such unexpected sites.

Several groups, including ours, have identified cis-acting elements and trans-acting factors that mediate *Gnrhr* expression in pituitary gonadotrope cells. In particular, *in vivo* and *in vitro* approaches have demonstrated that, in addition to their leading role in early stages of pituitary ontogenesis, the LIM homeodomain proteins LHX3 and ISL1 play a crucial role in cell-specific expression of *Gnrhr* in the developing pituitary [13, 14]. Interestingly, these homeodomain transcription factors are also key regulators of several developmental pathways. In particular, LIM homeodomain proteins LHX3 and ISL1 synergize with bHLH transcription factors to specify motor neuron subtype identity in the embryonic spinal cord [15]. In the chicken retina, photoreceptors transiently express LIM

homeodomain proteins during development, before the onset of synaptogenesis and expression of terminal differentiation marker genes such as those encoding photopigments [16]. Besides, conditional inactivation of *Isl1* in the primordium of the neural retina leads to a significant reduction in bipolar, cholinergic amacrine and ganglion cells [17]. *In situ* hybridization experiments further demonstrate that bipolar cells not only express *Isl1* but also *Lhx3*, *Lhx4* and *Nli* (*Ldb1*), the latter mediating homo and heterodimerisation of LIM domain transcription factors. Another homeodomain transcription factor, OTX2, the vertebrate ortholog of the drosophila orthodenticle factor, was recently shown to be involved in both pituitary and retina development. Indeed, in human, if most of the OTX2 heterozygous loss-of-function mutations cause severe ocular malformations [18], several novel mutations have been recently reported to result either in isolated combined pituitary hormone deficiency [19] or in pituitary hormone deficits associated with ocular malformation [20, 21, 22].

The retina is functionally related to the pineal gland. Indeed, pinealocyte and retinal photoreceptors have probably evolved from an ancestral photoreceptor as evidenced by the expression, in both tissues, of common marker genes involved in phototransduction and melatonin synthesis [23, 24]. Furthermore, these marker genes are controlled by similar transcription factors such as the paired-like homeodomain transcription factors OTX2 and CRX (Cone-Rod homeoboX-containing gene), as well as PAX6, a member of the paired box gene family. OTX2 is expressed notably in rod and cone photoreceptors as well as in pinealocytes [24, 25]. Conditional *Otx2* ablation in mice precludes retinal photoreceptor cell fate determination and development of the pineal gland [26]. Similarly, targeted disruption of *Crx* results in decreased expression of photoreceptor- and pineal-specific genes with associated retinopathy and attenuated circadian entrainment [27]. Homozygous small eye (*Sey/Sey*) mice lacking functional PAX6 protein fail to develop a pineal gland [28]. Likewise, conditional inactivation of *Pax6* in retinal progenitor cells results in the exclusive generation of amacrine interneurons, thus restricting the retinogenic potential of progenitor cells to only one of the six cell fates normally expected [29].

The presence of common transcription factors in the pituitary and retina together with the close functional relationship between the retina and pineal gland led us to assess whether these organs express *Gnrhr*. We thus first used the transgenic model expressing *Gnrhr-hPLAP* to monitor *Gnrhr*

promoter activity during retina and pineal gland development *in vivo*. We also analyzed the transcriptional mechanisms involved in retina and pineal-specific activity of *Gnrhr* promoter.

## **Materials and Methods**

Animals were housed and maintained according to published national guidelines and with approval from the experimental animal committee of the Jacques Monod Institute (Agreement A75-05-09, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 6 and Paris 7 Universities, Paris, France). Three transgenic mouse strains expressing *hPLAP* under the control of the *Gnrhr* promoter have been generated by additional transgenesis as previously described [10]. The *Gnrhr-hPLAP* transgene was integrated as a single copy gene in the strain used in this study.

## **Histochemistry and immunocytochemistry**

Experiments were performed as previously described [10, 13]. Briefly, male transgenic mice homozygous for the 3.3 kb *Gnrhr-hPLAP* (Strain 1) were used (2-3 animals for each age group). Mouse heads or dissected brains were fixed in 4% paraformaldehyde. After two washes with PBS, tissue samples were successively incubated in 12, 15, and 18% sucrose in PBS at 4°C for 24 h each, and then frozen at -60°C. Sixteen micrometer cryostat sections of brains were mounted onto slides, heated at 65°C to inhibit endogenous phosphatases, and incubated with a mixture of chromogenic enzyme substrates containing nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) in the appropriate buffer. To visualize nuclei, 4', cis-diamidino-2-phenylindol (DAPI) staining was used as a counter stain.

## **Cell cultures and plasmid constructs**

CHO and  $\alpha$ T3-1 cell lines were maintained in monolayer cultures using high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 50  $\mu$ g/ml gentamicin at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air. The *Gnrhr* promoter luciferase fusion constructs were previously described and numbered relative to the A of the ATG translation start codon at position +1 [13, 30, 31]. Briefly, the pLuc1.1kb*Gnrhr* construct resulted from the insertion of the -1135/-32 fragment of the

5'upstream sequence of the rat *Gnrhr* promoter into the pGL3 basic vector containing the firefly luciferase reporter gene (Promega). This promoter fragment includes the start sites of transcription previously described and all the *cis*-active elements that have been characterized in  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 gonadotrope cell lines. Activity of this construct displayed a 13- to 14-fold increase over the minimal prolactin (*Prl*) promoter in gonadotrope cells. Other *Gnrhr* promoter fusion constructs were obtained by 5' deletion, generating promoter fragments ending at -475 (pLuc0.44*Gnrhr*), -316, -222, -180, -136, -101, and -56. The pLuc0.44*Gnrhr* is deleted of the LIM homeodomain response element and displays a 4- to 5-fold activity over minimal *Prl* promoter in gonadotrope cell lines. Luciferase constructs containing promoters mutated on CREB and AP1 elements have been previously described [13]. Promoters mutated on the TAAT motifs within the -475/+32 region were obtained according to the same strategy. Briefly, reverse and forward primers (see **table 1**) containing mutated TAAT motifs were used in two separate PCR together with forward and reverse primers complementary to pGL3 vector sequences flanking the -475/+32 promoter, respectively. The resulting products from these two PCR, that partially overlap on the mutated TAAT motif, were mixed together and then used as template DNA in a third PCR using the pGL3 primers to reconstruct the entire mutated promoter. The amplified product was then digested with *HindIII* and *XhoI* restriction enzymes, gel purified, and inserted into the modified pGL3 basic vector as previously described [13]. Expression vectors coding for ISL1, LHX3 and CREB and CRX were obtained from Dr. Jacques Salbert, Pr. Simon Rhodes, Dr. Richard Montminy and Dr. Marianne Bernard, respectively. Expression vectors for OTX2 and NUR77 were obtained from Dr. Thomas Lamonerie and Dr. Pulak Manna, respectively. Expression vectors for PITX1 and PITX2 were obtained from Dr. Hélène Quentien. PROP1 expression vector was generated in the laboratory. Briefly, total RNA purified from rat pituitary was reverse transcribed and the resulting cDNA was amplified using *Prop1*-specific sense and antisense primers containing restriction sites for *BamHI* and *EcoRI*, respectively. The amplified product was then digested with restriction enzymes and inserted into the pcDNA3.1(-)/myc-His A plasmid (Invitrogen) using classical procedures. OTX1 expression plasmid was obtained following the same procedure except that mouse pituitary RNA was used as template for reverse transcriptase.

### Transient transfection assays

CHO cells were transfected with rat *Gnrhr* promoter luciferase fusion constructs (150 ng) together with pRL-SV (10 ng) and co-transfected with expression vectors (10 ng each) or equivalent amount of pcDNA3 using 0.9 µl Lipofectamine 2000 in 100 µl Opti-MEM culture medium per well of a 48-well plate for 4 to 6 h. According to the alternate supplier's protocol, cells were plated together with the transfection mix (Invitrogen). Thereafter, 400 µl of DMEM medium supplemented with 2% fetal bovine serum and 10 µg/ml gentamicin were added to each well. The pRL-SV vector (Promega) expressing *Renilla* luciferase reporter gene under control of the early SV40 enhancer/promoter region was systematically used to monitor transfection efficiency. Promoter activity was measured 36 h after transfection using the dual luciferase assay (Promega) and evaluated as the ratio of firefly luciferase activity to *Renilla* luciferase activity.

### RNA preparation, reverse transcription and PCR amplification

Total RNA was isolated from tissues of developing and 5 week-old Sprague-Dawley rats using Tri Reagent (Sigma-Aldrich) or with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) for younger rats (E19-P0 retinas). First strand cDNA from 1 µg RNA of each sample was synthesized using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplifications were usually performed for 35 cycles using a Biorad gradient thermal cycler, in a final volume of 20 µl with 0.4 µl cDNA solution. In the developing retinas, 40-cycle PCR were performed in a final volume of 50 µl with 10 µl cDNA solution using E2-E3 forward and reverse primers (**table 2**). In adult pineal and retina, a first amplification of 25 cycles was performed using 2 µl cDNA solution in 50 µl solution, followed by 35 cycles performed on 1 µl of the previous amplification product in a final volume of 50 µl. During the first round, the primers used were *Gnrhr* (E1-E2) forward and *Gnrhr* (E2-E3) reverse. The second semi-nested amplification was performed using the *Gnrhr* (E1-E2) forward and reverse primers. The oligonucleotide primer sequences used were as indicated in **table 2**.

## Results

### Transgene expression in the retina and pineal gland during ontogenesis

To determine whether *Gnrhr* promoter is active in retina and pineal gland, we monitored its activity *in vivo* using our transgenic mouse model expressing the *hPLAP* under the control of the 3.3 kb rat *Gnrhr* promoter. Analyses were performed on serial brain sections at various stages of development and revealed that transgene is expressed in both organs during embryonic development. Staining was detected as early as at embryonic day (E) 13.5 in some but not all cells of the developing pineal gland (Fig. 1A). At E14.5, two populations of cells could also be detected, those expressing *Gnrhr-PLAP* and those remaining negative for transgene expression (Fig. 1B). Correspondingly, at E18.5 (not illustrated) as well as at birth referred to as postnatal day (P) 0, only approximately half of the pineal cells were consistently stained, forming chain-like clusters (Fig. 1C). A strong staining was also observed in the developing retina. However, the onset of transgene expression occurred later than in the pineal since it was not detected at E14.5 (not illustrated). At E17.5, a 3-dimensional reconstitution using serial sagittal sections of the eye allowed the localization of the unlabeled region of the retina (Fig. 1D-G). This region was restricted to the caudo-temporal domain, and the overall staining corresponded to areas where neuroblast division still occurs, mainly close to the peripheral edges of the retina. At E17.5 and E18.5, two cell layers were distinguished in the neural retina, the neuroblast and ganglion cell layers (Fig. 1H-J). A robust staining was detected at the outer edge of the neuroblast layer together with a weaker labeling at the neuroblast and ganglion cell layer boundary (Fig. 1J). Interestingly, some labeled cells of neuron-like appearance were obviously present at the boundary between neuroblast and ganglion cell layers, suggesting that some cell migrations occur between outer and inner cell layers (Fig. 1I). Consistently, a faint staining was observed in the differentiated ganglion cells together with labeled fibers within the optic nerve (Fig. 1K). At birth, staining was equivalent to E18.5 with a predominant transgene expression within the neuroblast layer and only a faint expression at the neuroblast and ganglion cell layer boundary (Fig. 1L).

In the post-natal retina, transgene expression was still observed at P7, but was restricted to a thin dorsal-temporal region (Fig. 2, A-B). Furthermore, staining in the adult retina at P44 was either no



longer visible or strongly decreased depending on the animals tested. When present, staining was restricted to 4 differentiated layers: the external segment of photoreceptors, the outer and inner plexiform layers and the ganglion cell layer (Fig. 2C). In rodent, the mature pineal gland is composed of three parts, the superior pineal, the pineal stalk, and the deep pineal [32]. In the course of mouse brain dissection at the postnatal stages of development here illustrated (P8 and P44, Fig. 2), the superior pineal was usually lost in contrast to pineal stalk and deep pineal. After birth, transgene expression was still present in these two parts of the pineal gland (Fig. 2D-E), with strongly labeled cells localized notably in the pineal stalk at P8 (Fig. 2E). Similarly, at P44, hPLAP activity was clearly detected in the stalk part and deep pineal gland (Fig. 2F). Counter-staining with DAPI underlined the presence of unlabeled cells intermingled with transgene expressing cells in both the stalk (Fig. 2E) and deep (Fig. 2G) pineal.

### **The *Gnrhr* is expressed with *Otx2* in the pituitary, the pineal gland and the retina**

To verify whether the retina and the pineal gland express genuine *Gnrhr* as well as the gene encoding its ligand, developing and adult rat tissues were dissected and RNA was analyzed by reverse transcription coupled to PCR (see Materials and Methods). Primers used are indicated in Table 2. In the developing retina at E19 as well as at birth *Gnrhr* mRNA was detected, indicating that the endogenous *Gnrhr* gene is transcribed in this organ (Fig. 3A, left panel). A similar observation was done for the gene encoding the ligand *Gnrh* gene. In adult animals, *Gnrhr* expression was obvious in the pituitary, as expected, whereas expression in retina and pineal gland was only detected using nested RT-PCR (Fig. 3A, right panel). Further, both pituitary gland and retina expressed *Gnrh* mRNA whereas it was not detected in the pineal gland.

In the pituitary, *Gnrhr* expression is regulated by different transcription factors interacting with specific response elements on the *Gnrhr* promoter (Fig. 3B), and that may also be involved in retina- and pineal-specific *Gnrhr* expression. These factors include the LIM homeodomain proteins LHX3 and ISL1, acting as heterodimers to transactivate rat *Gnrhr* promoter in gonadotrope cells through a distal response element localized at -873/-852 [13]. *Gnrhr* gonadotrope transcription also implicates the well characterized factors Activator protein 1 (AP1), NR5A1 (nuclear receptor subfamily 5, group A,

member 1), most commonly referred to as steroidogenic factor 1 (SF1), and cyclic AMP response element binding protein (CREB) [30, 31]. These factors bind to elements clustered within the proximal domain. Four additional factors were taken into account: the paired-like factor Prophet of PIT1 (PROP1) and the mammalian homologue of drosophila Orthodenticle 1 (OTX1) for their role in gonadotrope differentiation and function, NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1, most commonly referred to as NUR77) for its modulatory role on mouse *Gnrhr* expression, and lastly OTX2 for its leading role in retina and pineal differentiation [26, 33, 34, 35,36, 37].

To determine whether some of these transcription factors might activate transgene expression in the retina and the pineal gland, we have first analyzed their mRNA levels in these two tissues. Inspection of transcription factor gene expression revealed that the pituitary code involving LIM, paired-like homeodomain proteins and nuclear receptor SF1 is incomplete within these tissues (Fig. 3C). Indeed, whereas mRNA encoding for *Otx1*, *Creb*, *cFos*, and *Nur77* were found to be expressed in all tissues tested, *Sf1* and *Prop1* mRNA were detected neither in the retina nor in the pineal gland. Furthermore, the two LIM homeodomain mRNA *Isl1* and *Lhx3* were detected in the retina but not in the pineal gland. As expected, *Otx2* mRNA was detected in both the retina and pineal. Interestingly, *Otx2* mRNA was also expressed in the pituitary.

**The pineal/retina transcription factor OTX2 acts in synergy with CREB in non gonadotrope cells whereas it cooperates with PROP1 in gonadotrope context**

To determine the transactivating abilities of the identified transcription factors, expression vectors encoding CREB, NUR77, OTX2, ISL1 and LHX3 were cotransfected together with the luciferase construct driven by the 1.1 kb rat *Gnrhr* promoter (pLuc1.1*Gnrhr*) into the CHO cell line (Fig. 3D). As already observed in previous experiments, when transfected alone, pLuc1.1*Gnrhr* only displayed a very reduced luciferase activity (Fig. 3D) similar to the empty pGL3 vector (not illustrated), indicating that CHO cells do not express *Gnrhr*-specific transcription factors. When cells were cotransfected with pLuc1.1*Gnrhr* and expression vector coding either for CREB, NUR77, OTX2 or a combination of ISL1 and LHX3, in order to reconstitute an active heterodimer, only CREB was able to enhance *Gnrhr* promoter activity. Various combinations of transcription factors were then examined. Interestingly, in

the absence of CREB, none of the combinations tested was efficient on promoter activity (Fig. 3D). Furthermore, adding CREB in most combinations led to a marked increase in promoter activity, demonstrating a synergistic effect between CREB and ISL1/LHX3 or OTX2. NUR77 also increased CREB-induced stimulation but the increase was not significant as compared with CREB alone. The association of CREB with OTX2 (or with LHX3/ISL1) led to an 8-fold increase in luciferase activity. This increase in promoter activity could not be further significantly enhanced by the addition of any other factor tested. Co-transfection assays in CHO cells of a shorter *Gnrhr* promoter (-475/-32) construct (pLuc0.44*Gnrhr*) together with expression vectors for CREB and OTX2 indicated that OTX2 response was preserved with this proximal promoter fragment (data not shown). Because homeodomain transcription factors interact with response elements containing a TAAT core motif, at least one of the eight TAAT motifs identified within this proximal promoter might be involved in OTX2 responsiveness.

Given that *Lhx3* and *Isl1* transcripts were not detected in the pineal gland, these data suggest that OTX2 together with CREB are the best candidates for stimulation of *Gnrhr* expression in both pineal gland and retina. Since OTX2 and CREB were also detected in the pituitary, they may further contribute to the gonadotrope-specific transcription code that activates pituitary *Gnrhr*. Therefore, in addition to the CHO cell line used as a non-pituitary cell model, the  $\alpha$ T3-1 cell line, commonly used to study marker genes of the gonadotrope lineage, was chosen here to monitor the potential effects of CREB and OTX2. Surprisingly and in contrast with CHO cells, no cooperative effect of OTX2 with CREB was observed in the gonadotrope cell context whatever the construct tested, long or short promoter/luciferase fusion constructs (data not shown). Further analysis was then carried out with other transcription factors, namely OTX1, ISL1, LHX3, and PROP1. Co-transfection assays of expression vectors for these factors together with pLuc0.44*Gnrhr* construct in  $\alpha$ T3-1 cells indicated that only PROP1 cooperated with OTX2 (or OTX1), the latter being completely ineffective alone as already observed in CHO cells (Fig. 3E).

**In non gonadotrope cells, *Gnrhr* promoter activation mediated by OTX2 involves DNA motif distinct from gonadotrope response element.**

We then designed promoters mutated on four different TAAT motifs present within the -475/-32 promoter region of the pLuc0.44*Gnrhr* construct. To identify the OTX2 response elements, these mutant promoters were first tested in the  $\alpha$ T3-1 cell line using the pituitary-specific PROP1/OTX2 combination. As illustrated in Fig 4B, two of these motifs, numbered 2 and 3 were involved in the transacting capacity of PROP1/OTX2 in  $\alpha$ T3-1 gonadotrope cells. In particular, mutation of the TAAT numbered 2 abolished the PROP1/OTX2 stimulation of *Gnrhr* promoter activity in gonadotrope cells (Fig. 4B). Targeted mutation of the TAAT numbered 3 was far less effective, decreasing only slightly the PROP1/OTX2 effect. To determine whether PROP1/OTX2 might transactivate the *Rgnrh* promoter in a cooperative manner in a non gonadotrope cell context, CHO cells were cotransfected with pLuc0.44*Gnrhr* together with expression vector encoding for PROP1 and OTX2. As illustrated in Figure 4B (lower panel), PROP1 was able to stimulate the *Gnrhr* promoter under these conditions. However, in contrast with  $\alpha$ T3-1 cells, the cooperative effect of OTX2 was lost suggesting that one or several additional partners specifically expressed in gonadotrope cells are required.

The TAAT mutants were then tested in the CHO cell context to determine whether similar or different motifs were implicated in OTX2/CREB responsiveness. None of these TAAT mutations prevented the CREB/OTX2 response (Fig. 4C). Rather, mutation of TAAT 2, 3, and 4 led to increased promoter activity in response to CREB or CREB/OTX2 stimulations. Thus, these TAAT core motifs do not mediate OTX2 transactivation in CHO cells in contrast with  $\alpha$ T3-1 cells. To delineate CREB/OTX2 response elements, we further used promoters harboring targeted mutations on CREB and AP1 response elements as previously described [13]. Single mutation targeting either the AP1 or CREB response element was inefficient. Only mutations on both AP1 and CREB response elements dramatically reduced promoter activity in response to CREB and CREB/OTX2, suggesting that CREB interacts indifferently with either AP1 response element or CRE. In the AP1/CRE mutant construct tested, the CREB response appeared to be partially preserved whereas the functional interaction between CREB and OTX2 was fully abolished.

The data presented above suggested that functional interaction between OTX2 and CREB required binding of CREB to DNA at the AP1 and/or CREB response element. To assess whether this functional interaction also required OTX2 binding to a *bona fide* element, sequence of the -475/-32

promoter fragment was further analyzed, revealing four additional TAAT motifs, referred to as TAAT 5 to 8, and located at -439/-436, -331/-328, -201/-198, and -163/-160 (Fig.5A). To evaluate their potential implication in CREB/OTX2 interaction, 5'deletion mutants were tested for their ability to respond to CREB and OTX2 (Fig. 5B). Deletion of the promoter fragment located between -475 and -316 did not alter the response to CREB/OTX2, thus excluding the 2 TAAT motifs (numbered 5 and 6), located at -439 and -331. This also corroborated the non-involvement of the other TAAT motifs located within this region (numbered 1, 2, 3, and 4). Deletion of promoter up to -180 did not prevent full response to CREB and CREB/OTX2 stimulation, further excluding the implication of the -201/-198 TAAT motif (numbered 7). Additional deletion to -136 specifically abolished OTX2 stimulation without interfering with CREB-induced stimulation, suggesting that the OTX2 response element is located between -180 and -136. The core TAAT motif of response elements for homeodomain transcription factors at -163/-160 (numbered 8) is thus likely involved in OTX2 response. Additional further deletions to -101 or -56, leading to CRE deletion, abolished CREB-induced stimulation, in agreement with data obtained with the double CRE/AP1 mutant. Altogether, these data suggested that the stimulation induced by CREB is mediated through both AP1 element and CRE whereas the stimulatory effect of OTX2 depends on the TAAT motif located at -163/-160 (Fig. 6). Interestingly, this motif displayed sequence homology with the PROP1/OTX2 response element with four homologous bases nearby the TAAT core motif (Fig. 6).

## Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time that rat *Gnrhr* promoter is active *in vivo* in two functionally related organs, the retina and the pineal gland. The onset of gene activity occurs during embryonic life, first in the pineal gland as early as E13.5 and later on in the retina, at E17.5. We also provide evidence that some of the transcription factors activating *Gnrhr* in gonadotrope cells such as CREB and NUR77 are present in these tissues. However, some critical gonadotrope-specific factors are either absent, like SF1, or only detected in the retina like LHX3 and ISL1. More importantly, we establish that a major transcription factor presiding to both pineal and retina cell differentiation, OTX2, is also a key factor directing *Gnrhr* promoter activity in pituitary as well as in non-pituitary cells. Indeed, in transient transfection assays in non gonadotrope CHO cells, OTX2 acts synergistically with CREB

to activate the *Gnrhr* promoter. In these cells, CREB enhances promoter activity through the same response element previously identified in gonadotrope cells. However, it may also alternatively transactivate the promoter through the AP1 element. In these cells, OTX2 acts *via* a newly characterized response element which is localized in the proximal part of the promoter at 60 bp upstream of the CREB response element. In contrast, in gonadotrope cells, OTX2 associates with PROP1, but not with CREB, and this tandem of paired-like homeodomain factors interacts on two TAAT motifs located between -388 and -357 in the vicinity of the AP1 element. Altogether, these data suggest that the combinatorial code presiding to pineal- and retina-specific expression of the *Gnrhr* is different from the gonadotrope-specific combination. The underlying mechanisms may result, at least in part, from different associations of transcription factors as evidenced by the fact that OTX2 preferentially cooperates with CREB in an extra pituitary cell context whereas it preferentially associates with PROP1 in a gonadotrope cell context. We cannot however exclude that additional mechanisms take place *in vivo* in *Gnrhr*-expressing cells of the retina and pineal gland.

The ontogenetic expression of *Otx2* mRNA and protein in the retina have been previously reported in the rat [38]. OTX2 was expressed at E20 (approximately equivalent to E18-E19 in the mouse) in the retina pigment epithelium and mainly in the outer part of the neural retina. In addition, OTX2 was also present in the ganglion cell layer and at the boundary between the neuroblast and ganglion cell layers. With the exception of the retinal pigment epithelium, the spatial pattern of OTX2 expression therefore reflects the topological repartition of transgene expression. In the adult mouse retina, cytoplasmic transgene expression in the external segments of photoreceptor and in their axonal projections is also in agreement with the described OTX2 expression in photoreceptor nuclei of the outer nuclear layer [25].

Data obtained in gonadotrope cells suggest that OTX2 also participates, together with PROP1, to the regulation of *Gnrhr* expression. Recently, two other targets of OTX2 have been identified in the pituitary, the genes encoding for the paired-like transcriptional repressor HESX1 and the Pou-homeodomain factor POU1F1, most commonly referred to as PIT1 [20]. Both factors play crucial roles in pituitary ontogenesis [for review see 39]. HESX1 is transiently expressed until E12 and prevents the premature expression of PROP1, which, in turn, together with  $\beta$ -catenin represses *Hesx1* expression

after E12. Both factors are sequentially required for the proper expression of PIT1, which, in turn, is required for the differentiation of the somatotrope, lactotrope and thyrotrope lineages. Our data showing the activation of the *Gnrhr* promoter by OTX2 further suggest a direct involvement of OTX2 in the terminal differentiation and/or maintenance of the gonadotrope lineage. Thus, OTX2 could perform distinct functions in pituitary lineage specification depending on the stage of pituitary development, in the early steps by activating *Hesx1*, and, later on, by regulating *Pit1* as well as *Gnrhr* expression. Comparatively, in mouse retina and pineal gland, OTX2 is required for appropriate differentiation of photoreceptors and pinealocytes, respectively. Consistent with this, OTX2 transactivates several genes in both organs, namely genes encoding for arylalkylamine N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase which are enzymes involved in melatonin synthesis. More importantly, OTX2 transactivates *Crx* that encodes a transcription factor belonging to the same family. *Otx2* expression in the rat retina is detected at E16 and precedes the expression of *Crx* [38]. The expression of both genes is maintained several weeks after birth suggesting that they play major roles not only during ontogenesis but also after the achievement of photoreceptor cell and pinealocyte differentiation. In human patients, OTX2 loss-of-function mutations are associated with a broad spectrum of phenotypes that range from bilateral anophthalmia to mild microphthalmia. In addition, only a minor part of them causes combined or isolated pituitary deficiency. These variable phenotypes observed in human patients bearing an OTX2 mutation could reflect, at least for a part, functional redundancy between OTX2 and other factors, notably the closely related OTX1 factor. In support of such a hypothesis, we did not observe any significant difference in the activation of the *Gnrhr* promoter using either OTX1 or OTX2 in association with PROP1 (Fig. 3E). Lastly, the role of OTX2 in the regulation of *Gnrh* expression has been well characterized in the GT1-7 neuronal cell line [40]. Therefore, OTX2 might regulate expression of both receptor and ligand genes in these cells thus favoring the establishment of an autocrine regulatory loop.

In several organs including pituitary, hippocampus and amygdala, we have been able to correlate *Gnrhr-hPLAP* and genuine *Gnrhr* expression [11, 12]. Likewise, in the present study, we were able to detect endogenous *Gnrhr* expression in agreement with the ability of the pineal gland and retina to express the *hPLAP* transgene. However, the levels of *Gnrhr* expression in the retina, notably in the

adult animal, were noticeably lower than in the pituitary. The high sensitivity detection, reliability and reproducibility of the enzymatic hPLAP reaction is obviously a decisive advantage to study, at the cell level, sites that express low levels of *Gnrhr* mRNA or display low number of GnRHR-expressing cells. This improved detection as compared to *in situ* hybridization or radio-receptor assays, most probably explains why GnRHR has not been detected earlier in the retina and pineal gland. Indeed, to our knowledge, this is the first study reporting the expression of *Gnrhr* simultaneously in both organs in mammals. In other vertebrates such as teleost fishes, the presence of GnRHR in the retina has been suspected for several years because GnRH was reported to modulate the physiology of fish amacrine and ganglion cells, when applied exogenously [41]. Recent evidence reported that Class 1 GnRHR is indeed expressed in retinal amacrine cells of the teleost *Astatotilapia (Haplochromis) burtoni* whereas class 2 GnRHR is expressed in the ganglion cell layer [42]. Also, GnRHR was identified in the retina of four coral reef fishes [43]. The terminal nerve in fish constitutes the support of one vertebrate centrifugal visual system that has been extensively reviewed by Repérant et al [44, 45]. It projects to retina and mainly contains GnRH and FMRFamide immunoreactive materials. In mammals, data are extremely scarce and come from isolated observations in a few number of species like rhesus macaque, opossum, vole, bat and rat [44, 45, 46]. A limboretinal centrifugal visual system has been described in the rat, with GnRH immunoreactive neurons in the indusium griseum, the olfactory tubercles and most importantly in the dentate gyrus, which probably projects toward the retina [47]. In rodents, retinal GnRHR may thus be stimulated by GnRH transported through such potential centrifugal visual systems and these efferent fibers may influence retinal information processing. Because we have detected GnRH mRNA in the retina, an alternative and non exclusive hypothesis is that GnRH acts through paracrine and/or autocrine mechanisms within the retina. Regarding the pineal gland, *Gnrhr* mRNA expressed in the pituitary was further detected in the pineal gland of the European sea bass [48]. Recent data from this group have demonstrated that GnRH stimulated nocturnal melatonin release by the pineal organ [49]. Similar observations have been done *in vitro* on pineal glands isolated from adult female rats [50]. As suggested by the detection of immunoreactive fibers [51], GnRH could possibly reach the gland by direct neuronal projections. The neuropeptide might also be transported from the median eminence *via* the cerebrospinal fluid [52], although recent



data suggest that CSF GnRH only modulates sites close to the infundibular recess of the third ventricle [53].

It is well known that circadian rhythmicity and reproduction are interconnected. Many studies have indeed provided insight into the mechanisms by which melatonin affects GnRH secretion. The reciprocal relationship has been the subject of much fewer studies and the attempts to detect GnRHR in the pineal gland were of poor success in mammals [for review see 32]. The demonstration, in the present study, that *Gnrhr* is active both in pineal gland and retina, suggests that part of the mechanisms presiding to the onset of its expression might be conserved among vertebrates. A precise characterization of such mechanisms should help to better understand how GnRH interferes with seasonal and circadian control of reproductive physiology.

### **Acknowledgement**

We are greatly indebted to Dr. Marianne Bernard, Dr. Hélène Quentien, Dr. Jacques Salbert, Pr. Simon Rhodes, Dr. Richard Montminy, Dr. Thomas Lamonerie, and Dr. Pulak Manna for their kind collaboration in providing us with expression vectors. This study was supported by grants from the the Centre National de la Recherche Scientifique, the Paris 6 and the Paris 7 Universities, and the Agence Nationale pour la Recherche. ALS is supported by a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT).

## Figure legends

**Fig. 1. *hPLAP* expression in the pineal gland and retina during embryonic development and at birth.**

**Transgene expression in the pineal gland (A-C).** *hPLAP* activity was revealed by histochemistry using NBT/BCIP substrates and counterstained or not with DAPI (see Materials and Methods). Bright field images of transgene expression in the pineal gland at E13.5 (A), E14.5 (B), and at birth (left panel C), counterstained with DAPI (right panel C). **Transgene expression in the retina (D-L).** 3D reconstruction using 18 serial sections of the eye at E17.5 (D). The labeled areas appear in grey, the lens in blue and localization of the optic nerve is colored in pink. The schematic diagram at the top of panel D illustrates the orientation of the D1 to D4 views. The D1' schematic diagram indicates the localization of the E, F, and G sections. Bright field images of three out of the 18 serial sections used in the 3D reconstruction of the eye (E, F, G). Transgene expression in the retina at E18.5 (H), at the exit of the optic nerve (K), at birth (L). Higher magnification of the areas framed in H (I and J). Scale bars: 50  $\mu$ m in A,B,C, and K ; 100 $\mu$ m in E, F, G, H and L. Abbreviations: *bv*: blood vessel; *GCL*: ganglion cell layer; *NBL*: neuroblast cell layer.

**Fig. 2. *hPLAP* expression in the pineal gland and retina during the postnatal period.**

*hPLAP* expression was revealed by histochemistry using NBT/BCIP substrates and counterstained or not with DAPI (see Materials and Methods). **Transgene expression in the retina.** Bright field image of the retina at P7 (A) and P44 (C). In C, The different layers of the retina are indicated. Higher magnification of the area framed in A (B). **Transgene expression in the pineal gland** at P8 (D, E) and P44 (F, G). Bright field image of a coronal brain section illustrating *hPLAP* expression in pineal stalk (D). Higher magnification of the pineal stalk. (E) Bright field image of the pineal stack showing *hPLAP* staining in true colors (top left panel) and false red color (top right panel). Fluorescence image of DAPI counterstaining of the pineal stack (bottom left panel) and merged images of *hPLAP* staining

(red) and DAPI counterstaining (blue) (bottom right panel). Same image processing as in D and E at the level of the deep pineal gland at P44 (F and G). Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  in C; 100  $\mu\text{m}$  in A and F; 500  $\mu\text{m}$  in D. Abbreviations: V3: third ventricle; ME: median eminence; AQ: cerebral aqueduct; PS: pineal stalk; DP: deep pineal; rpe: retinal pigment epithelium; os: outer segment of photoreceptor cells; is: inner segment of photoreceptor cells; onl: outer nuclear layer ; opl: outer plexiform layer; inl: inner nuclear layer; ipt: inner plexiform layer; gcl: ganglion cell layer.

**Fig. 3. Mechanisms underlying *Gnrhr* promoter activity in an extra-pituitary context.**

***Gnrhr* and *Gnrh* transcripts in rat pineal gland and retina (A).** RNA from pineal and retina of developing and adult tissues were extracted, reverse-transcribed and cDNA was then amplified by PCR or by semi-nested PCR as described in Materials and Methods (see table 2 for primer sequences). **Schematic drawing of the -1135/-32 *Gnrhr* promoter/luciferase fusion construct (pLuc1.1*Gnrhr*) (B).** This schematic diagram illustrates active response elements characterized in the  $\alpha\text{T3-1}$  gonadotrope cell line. **Comparison of transcription factors transcripts detected in the pineal gland, retina and pituitary (C).** RNA from the three adult rat tissues was reverse-transcribed and amplified by PCR using the forward and reverse primers indicated in table 2. *Creb*, *cFos*, *Nur77* and *Otx2* transcripts were detected in the three tissues. **Synergistic activation of the *Gnrhr* promoter by CREB and OTX2 in an extra-pituitary context (D).** The pLuc1.1*Gnrhr* construct containing the firefly luciferase reporter gene under the control of -1135/-32 *Gnrhr* promoter into the pGL3 vector was transfected into the non gonadotrope CHO cells together with expression vectors either for CREB, OTX2, LIM homeodomain proteins LHX3 and ISL1 (LIM), NUR77 or same complementary amounts of pcDNA3 control vector (minus sign) as indicated. Fixed amounts (10 ng) of pSV-RL vector were also cotransfected in each well to monitor transfection efficiency. Values were calculated as indicated in Materials and Methods and expressed as fold stimulation over control pcDNA3 cotransfected cells. Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. **Synergistic activation of the *Gnrhr* promoter by PROP1 and OTX2 in gonadotrope cell context (E).** The pLuc0.44*Gnrhr* construct containing the firefly luciferase reporter gene under the control of -475/-32 *Gnrhr* promoter into the pGL3 vector was transfected into the gonadotrope  $\alpha\text{T3-1}$

cells together with one or two expression vectors, as described above for CHO cells. ns  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Fig. 4. Response elements involved in gonadotrope and non gonadotrope OTX2 responsiveness.**

**Schematic diagram of the short (-475/-32) promoter/luciferase fusion construct (pLuc0.44Gnrhr) illustrating the localization of the targeted mutations on four selected TAAT core motifs (black boxes) or on specific AP1, SF1 and CREB response elements (A).** The corresponding constructs were obtained by PCR amplification using mutated primers (table 1 and [31]) and inserted into the pGL3 vector upstream of the firefly luciferase reporter gene as indicated in Materials and Methods. **Response element involved in the PROP1/OTX2-induced transactivation of the Gnrhr promoter in gonadotrope cells (B).** The wild-type or mutated luciferase fusion constructs were cotransfected with PROP1 and OTX2 expression vectors or same amount of pcDNA3 control vector as indicated into either  $\alpha$ T3-1 or CHO cells. **Response element involved in the CREB/OTX2-induced transactivation of the Gnrhr promoter in non gonadotrope cells (C).** The wild-type or mutated luciferase fusion constructs were cotransfected into CHO cells with CREB and OTX2 expression vectors or same amount of pcDNA3 control vector as indicated. All other details were as indicated in Fig. 3D legend.

**Fig. 5. The TAAT located at -163/-160 mediates the OTX2-induced stimulation of the Gnrhr promoter in CHO cells.**

**Schematic diagram illustrating the four additional TAAT core motifs present in the proximal part of the Gnrhr promoter. (A).** The inactive TAAT motifs (1, 2, 3, and 4) previously tested are shaded off in grey tint. Also, the 5' end of truncated promoters is indicated (-316/-32 to -56/-32) to show which TAAT is deleted in each construct. **Deletion of the region encompassing the -163/-160 TAAT motif results in the abrogation of the OTX2 response (B).** Vectors containing the firefly luciferase reporter gene under the control of 5' deleted promoters were cotransfected with expression vectors for OTX2, CREB or pcDNA3 control vector as indicated. All other details were as indicated in Fig. 3D legend.

**Fig. 6. Schematic drawing illustrating the response elements involved in CREB/OTX2- and PROP1/OTX2-induced stimulation of *Gnrhr* promoter activity in extra-pituitary and gonadotrope cell context, respectively.**

In CHO cell context, CREB interacts with the consensus AP1 element at -352/-346 and with the CRE at -110/-103. The TAAT element on the antisense strand at -163/-160 mediates the effect of OTX2. In  $\alpha$ T3-1 gonadotrope cells, PROP1 and OTX2 interact primarily with the TAAT localized at -368/-365 and to a minor extent with the TAAT localized at -360/-357. Therefore, depending on the cell context, the same factor, here OTX2, associates with different partners, PROP1 in gonadotrope cells and CREB in CHO cells, through distinct response elements. Sequence alignment between the two OTX2 response elements was performed using the ClustalW2 program provided by the European Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). The (+) and (-) symbols indicate the orientation of each element relative to the respective promoter.

**Table 1. Sequence of sense and antisense primers used for TAAT targeted mutations.**

Luc-S and Luc-A designate the forward and reverse primers that anneal with pGL3 sequences flanking the -475/-32 *Gnrhr* promoter, respectively. Sequences of forward (S) and reverse (A) TAAT primers used for targeting mutation on the TAAT motifs numbered 1 to 4 in Fig. 3 are indicated and correspondingly numbered.

**Table 2. Sequence of primers used in RT-PCR analyses.**

RNA isolated from rat pineal gland and retina was reverse transcribed and the resulting cDNA were submitted to PCR amplification using the forward and reverse primers indicated. To avoid false positive, the forward and reverse primers were designed to anneal in two different exons. Concerning the *Gnrhr*, two sets of primers were used, the first designed to anneal with sequences located in exon 1 and 2 [*Gnrhr*(E1-E2)] and the second designed to anneal with sequences located in exons 2 and 3 [*Gnrhr*(E2-E3)].

## References

---

- 1 Leblanc P, Crumeyrolle M, Latouche J, Jordan D, Fillion G, L'Heritier A, Kordon C, Dussailant M, Rostène W, Haour F (1988) Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 48:482-488.
- 2 Ban E, Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Leblanc P, Heurtier JF, Drieu K, Fillion G, Haour F (1990) GnRH receptors in rat brain, pituitary and testis; modulation following surgical and gonadotropin-releasing hormone agonist-induced castration. *Mol Cell Endocrinol* 26:99-107.
- 3 Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM (1997) Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res* 52:475-490.
- 4 Botté MC, Chamagne AM, Carré MC, Counis R, Kottler ML (1998) Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* 159:179-189.
- 5 Moumni M, Kottler ML, Counis R (1994) Nucleotide sequence analysis of mRNAs predicts that rat pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptor proteins have identical primary structure. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1359-1366.
- 6 Bull P, Morales P, Huyser C, Socías T, Castellón EA (2000) Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 6:582-586.
- 7 Harrison GS, Wierman ME, Nett TM, Glode LM (2004) Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer* 11:725-748.
- 8 Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC (1999) Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 84:743-750.

- 9 Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R (1997) The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71:595-599.
- 10 Granger A, Ngô-Muller V, Bleux C, Guigon C, Pincas H, Magre S, Daegelen D, Tixier-Vidal A, Counis R, Laverrière JN (2004) The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* 145:983-993.
- 11 Schang AL, Ngô-Muller V, Bleux C, Granger A, Chenut MC, Loudes C, Magre S, Counis R, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN (2011) GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity. *Endocrinology* 152:568-580.
- 12 Schang AL, Counis R, Magre S, Bleux C, Granger A, Ngô-Muller V, Chenut MC, Ishaq M, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN (2011) Reporter transgenic mouse models highlight the dual endocrine and neural facet of GnRH receptor function. *Ann N Y Acad Sci* 1220:16-22.
- 13 Granger A, Bleux C, Kottler ML, Rhodes SJ, Counis R, Laverrière JN (2006) The LIM-homeodomain proteins *Isl-1* and *Lhx3* act with steroidogenic factor 1 to enhance gonadotrope-specific activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 20:2093-2108.
- 14 McGillivray SM, Bailey JS, Ramezani R, Kirkwood BJ, Mellon PL (2005) Mouse GnRH receptor gene expression is mediated by the LHX3 homeodomain protein. *Endocrinology* 146:2180-2185.
- 15 Lee SK, Pfaff SL (2003) Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38:731-745.

- 16 Fischer AJ, Foster S, Scott MA, Sherwood P (2008) Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina. *J Comp Neurol* 506:584-603.
- 17 Elshatory Y, Everhart D, Deng M, Xie X, Barlow RB, Gan L (2007) Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci* 27:12707-12720.
- 18 Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, Russell-Eggitt I, Fielder A, Gerrelli D, Martinez-Barbera JP, Ruddle P, Hurst J, Collin JR, Salt A, Cooper ST, Thompson PJ, Sisodiya SM, Williamson KA, Fitzpatrick DR, van Heyningen V, Hanson IM (2005) Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum Genet* 76:1008-1022.
- 19 Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S (2008) A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4351-4359.
- 20 Tajima T, Ohtake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K (2009) OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 94:314-319.
- 21 Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T (2010) Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756-764.
- 22 Henderson RH, Williamson KA, Kennedy JS, Webster AR, Holder GE, Robson AG, FitzPatrick DR, van Heyningen V, Moore AT (2009) A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol Vis* 15:2442-2447.



- 23 Klein DC (2004) The 2004 Aschoff/Pittendrigh lecture: Theory of the origin of the pineal gland--a tale of conflict and resolution. *J Biol Rhythms* 19:264-279.
- 24 Rath MF, Muñoz E, Ganguly S, Morin F, Shi Q, Klein DC, Møller M (2006) Expression of the *Otx2* homeobox gene in the developing mammalian brain: embryonic and adult expression in the pineal gland. *J Neurochem* 97:556-566.
- 25 Fossat N, Le Greneur C, Béby F, Vincent S, Godement P, Chatelain G, Lamonerie T (2007) A new GFP-tagged line reveals unexpected *Otx2* protein localization in retinal photoreceptors. *BMC Dev Biol* 7:122.
- 26 Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T (2003) *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6:1255-1263.
- 27 Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, Cepko CL (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice. *Nat Genet.* 23:466-470.
- 28 Estivill-Torrús G, Vitalis T, Fernández-Llebrez P, Price DJ (2001) The transcription factor *Pax6* is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ. *Mech Dev* 109:215-224.
- 29 Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P (2001) *Pax6* is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105:43-55.
- 30 Pincas H, Laverrière JN, Counis R (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulate the promoter activity of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene via a bipartite response element in gonadotrope-derived cells. *J Biol Chem* 276:23562-23571.

- 31 Pincas H, Amoyel K, Counis R, Laverrière JN (2001) Proximal cis-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:319-337.
- 32 Simonneaux V, Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55:325-395.
- 33 Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carrière C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-333.
- 34 Cushman LJ, Watkins-Chow DE, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Radak AL, Lloyd RV, Camper SA (2001) Persistent Prop1 expression delays gonadotrope differentiation and enhances pituitary tumor susceptibility. *Hum Mol Genet* 10:1141-1153.
- 35 Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA (2006) Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology* 147:1654-1663.
- 36 Acampora D, Mazan S, Tuorto F, Avantaggiato V, Tremblay JJ, Lazzaro D, di Carlo A, Mariano A, Macchia PE, Corte G, Macchia V, Drouin J, Brûlet P, Simeone A (1998) Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking Otx1 reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* 125:1229-1239.
- 37 Sadie H, Styger G, Hapgood J (2003) Expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene in alpha T3-1 gonadotrope cells is stimulated by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and protein kinase A, and is modulated by Steroidogenic factor-1 and Nur77. *Endocrinology*. 144: 1958-1971.

- 38 Rath MF, Morin F, Shi Q, Klein DC, Møller M (2007) Ontogenetic expression of the Otx2 and Crx homeobox genes in the retina of the rat. *Exp Eye Res* 85:65-73.
- 39 Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG (2007) Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87:933-963.
- 40 Larder R, Mellon PL (2009) Otx2 induction of the gonadotropin-releasing hormone promoter is modulated by direct interactions with Grg co-repressors. *J Biol Chem* 284:16966-16978.
- 41 Behrens U, Wagner HJ (2004) Terminal nerve and vision. *Microsc Res Tech* 65:25-32.
- 42 Grens KE, Greenwood AK, Fernaldab RD (2005) Two visual processing pathways are targeted by gonadotropin-releasing hormone in the retina. *Brain Behav Evol* 66:1-9.
- 43 Maruska KP, Tricas TC (2007) Gonadotropin-releasing hormone and receptor distributions in the visual processing regions of four coral reef fishes. *Brain Behav Evol* 70:40-56.
- 44 Repérant J, Ward R, Miceli D, Rio JP, Médina M, Kenigfest NB, Vesselkin NP (2006) The centrifugal visual system of vertebrates: a comparative analysis of its functional anatomical organization. *Brain Res Rev* 52:1-57.
- 45 Repérant J, Médina M, Ward R, Miceli D, Kenigfest NB, Rio JP, Vesselkin NP (2007) The evolution of the centrifugal visual system of vertebrates. A cladistic analysis and new hypotheses. *Brain Res Rev* 53:161-197.
- 46 Wirsig-Wiechmann CR, Wiechmann AF (2002) Vole retina is a target for gonadotropin-releasing hormone. *Brain Res* 950:210-217.
- 47 Vereczki V, Köves K, Csáki A, Grósz K, Hoffman GE, Fiskum G (2006) Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal

fibers: anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience* 140:1089-1100.

48 González-Martínez D, Madigou T, Mañanos E, Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Kah O, Muñoz-Cueto JA (2004) Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. *Biol Reprod* 70:1380-1391.

49 Servili A, Lethimonier C, Lareyre JJ, López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ, Kah O, Muñoz-Cueto JA (2010) The Highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology* 151: 2265-2275.

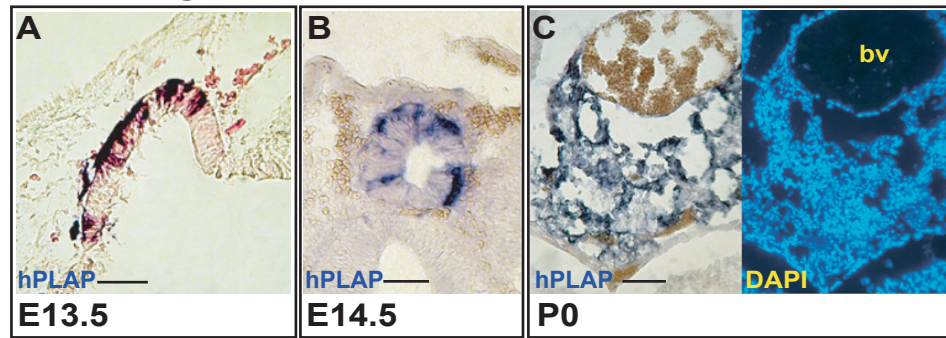
50 Itoh MT, Hosaka T, Mimuro T, Hamada N, Ishizuka B (2003) Gonadotropin-releasing hormone increases melatonin release in the pineal gland of the female rat in vitro. *Horm Metab Res* 35:153-157.

51 Park MK, Kogo H, Kawashima S, and Wakabayashi K (1995) Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive protein in the rat pineal gland. *J Neurosci Res* 41:386-393.

52 Skinner DC, Caraty A, Malpoux B, Evans NP (1997) Simultaneous measurement of gonadotropin-releasing hormone in the third ventricular cerebrospinal fluid and hypophyseal portal blood of the ewe. *Endocrinology* 138:4699-4704.

53 Caraty A, Skinner DC (2008) Gonadotropin-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid: endogenous distribution and exogenous uptake. *Endocrinology* 149:5227-5234.

## PINEAL GLAND



## RETINA

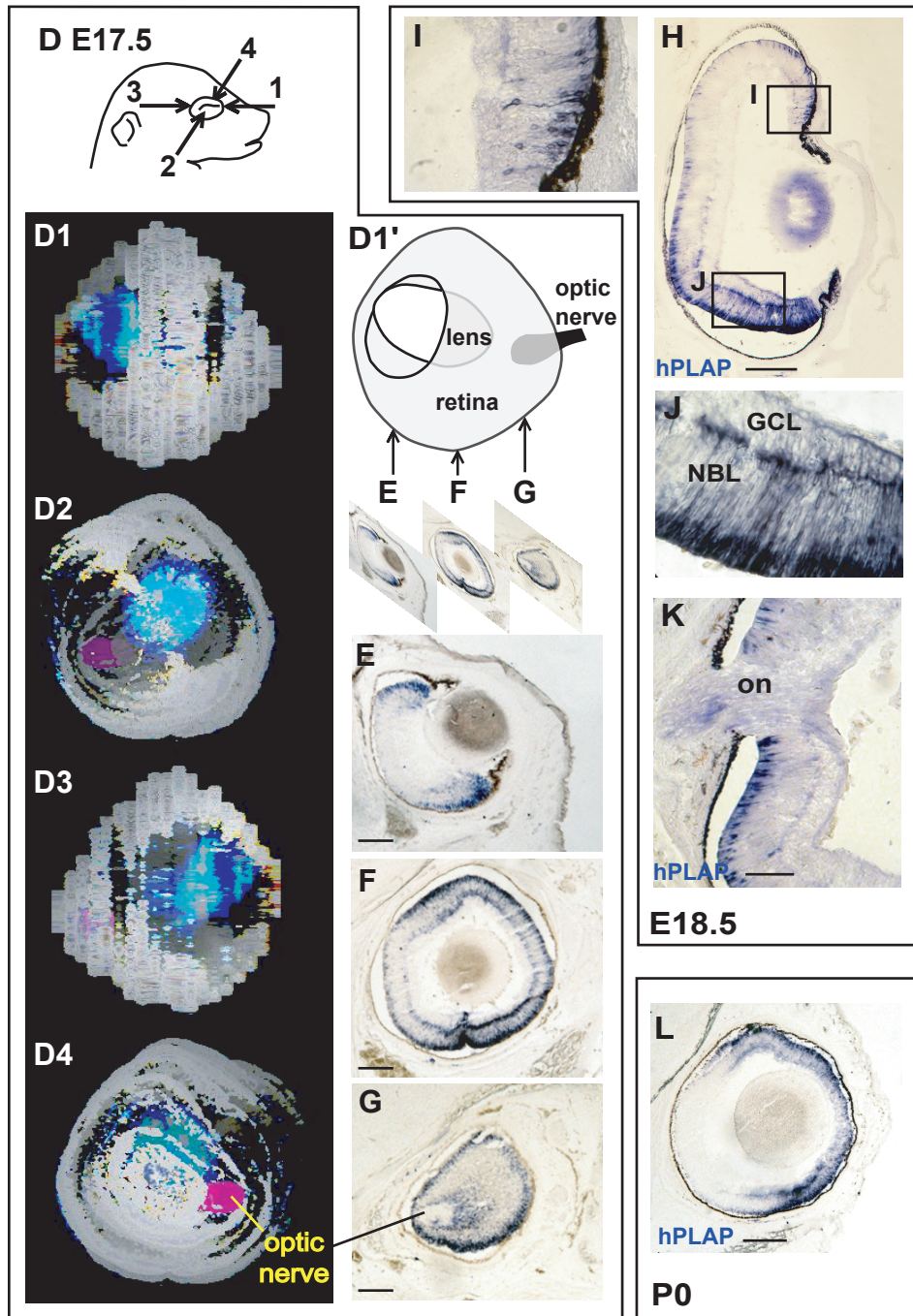
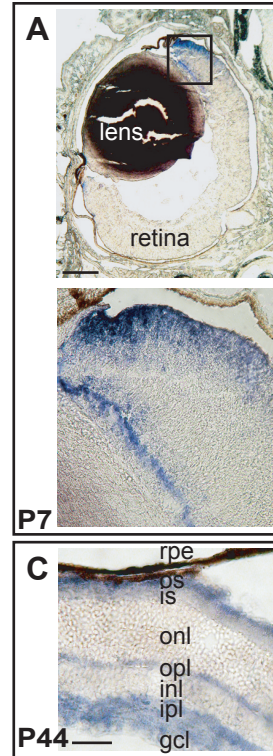


Figure 1

## RETINA



## PINEAL GLAND

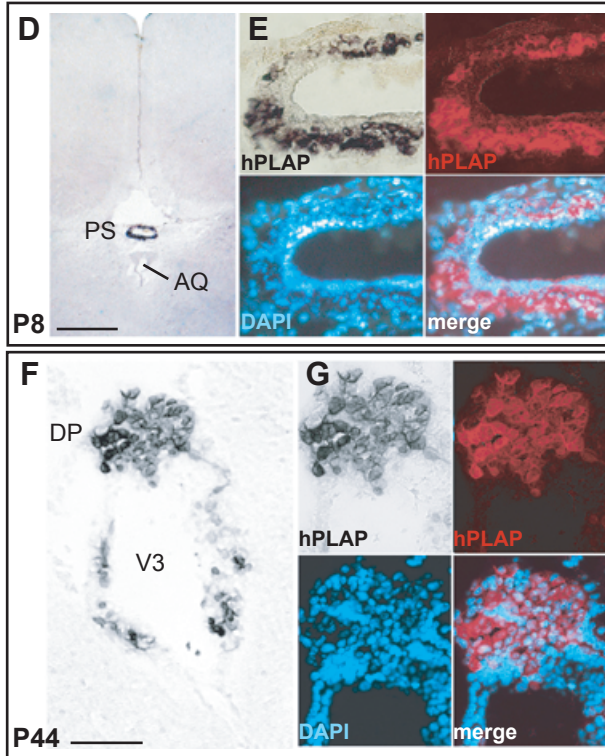


Figure 2

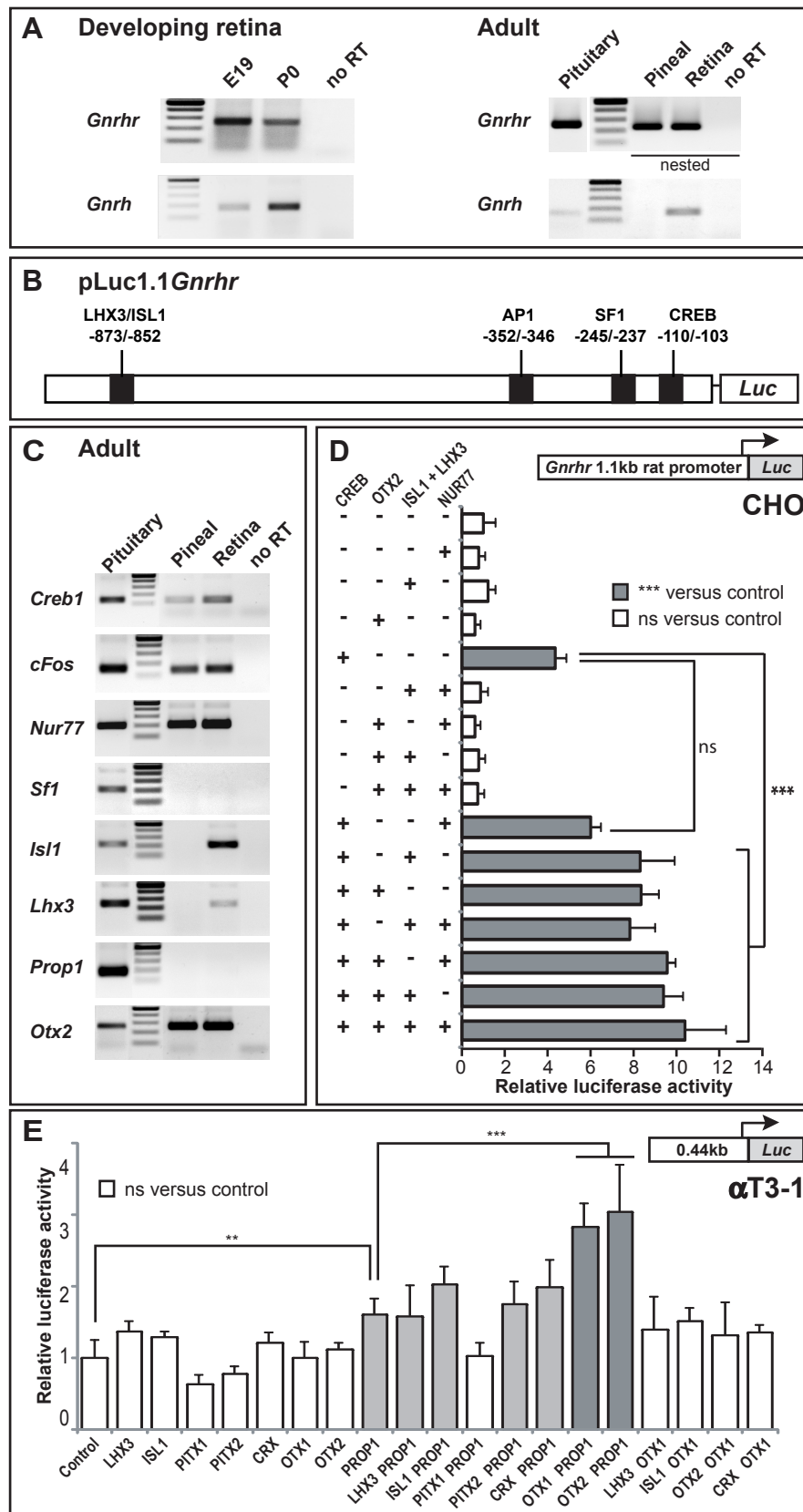


Figure 3

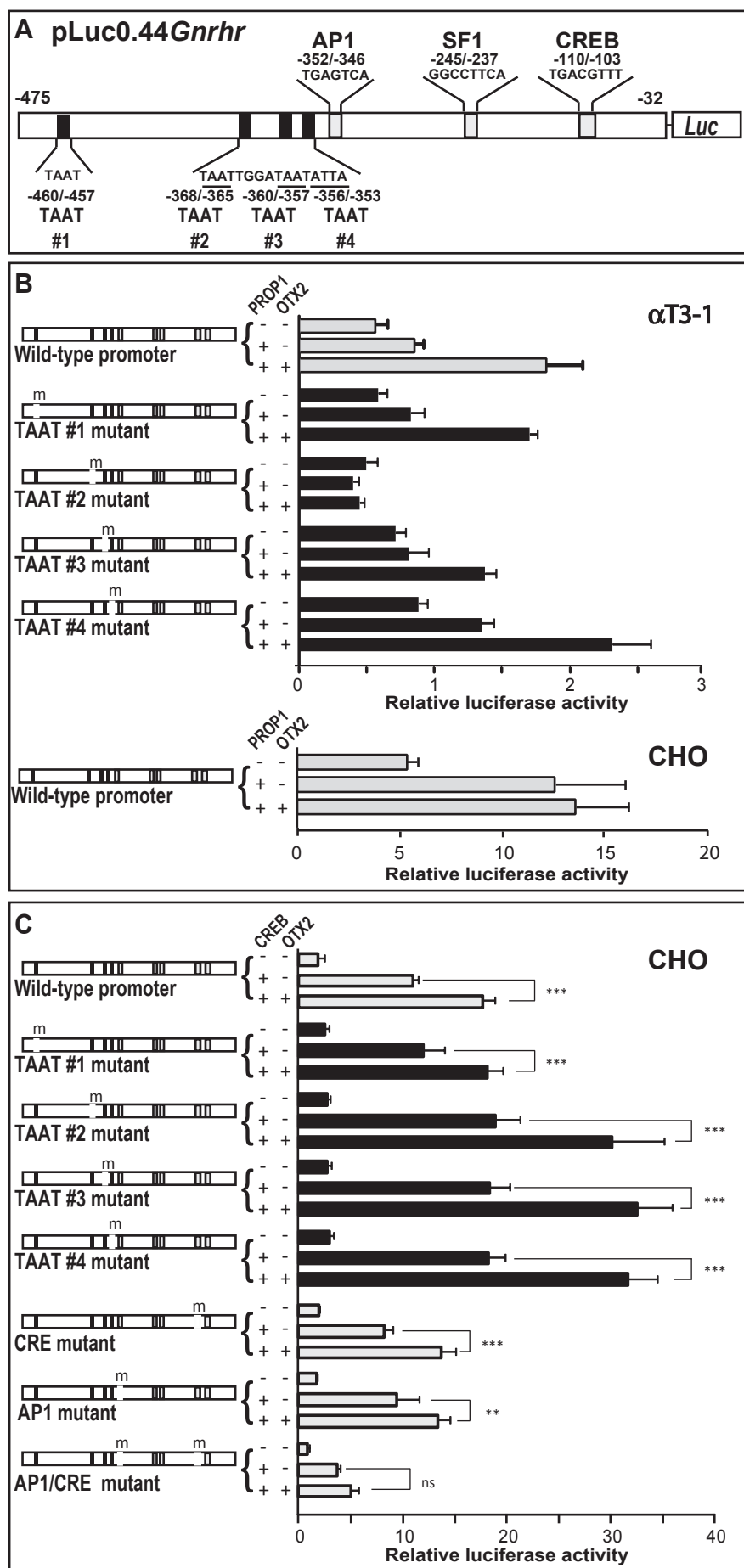


Figure 4



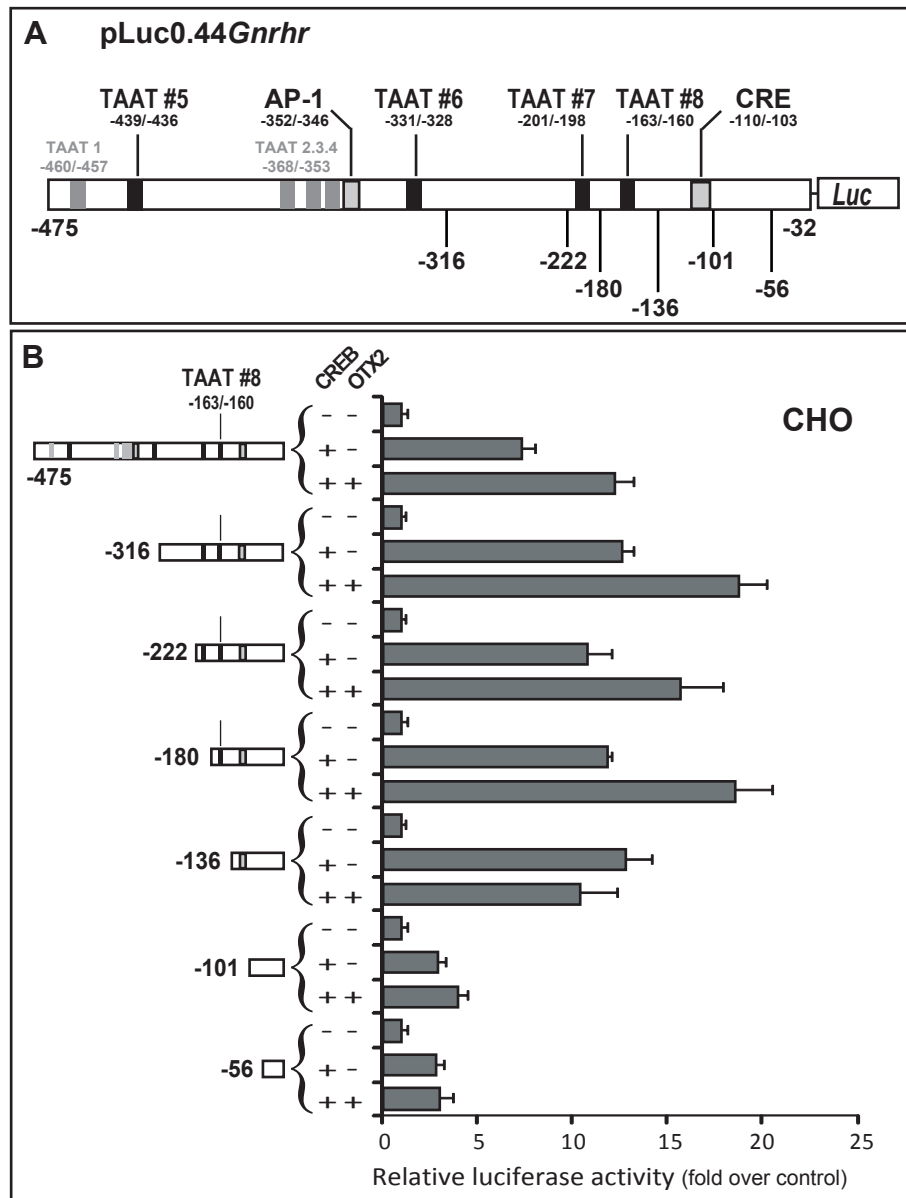


Figure 5

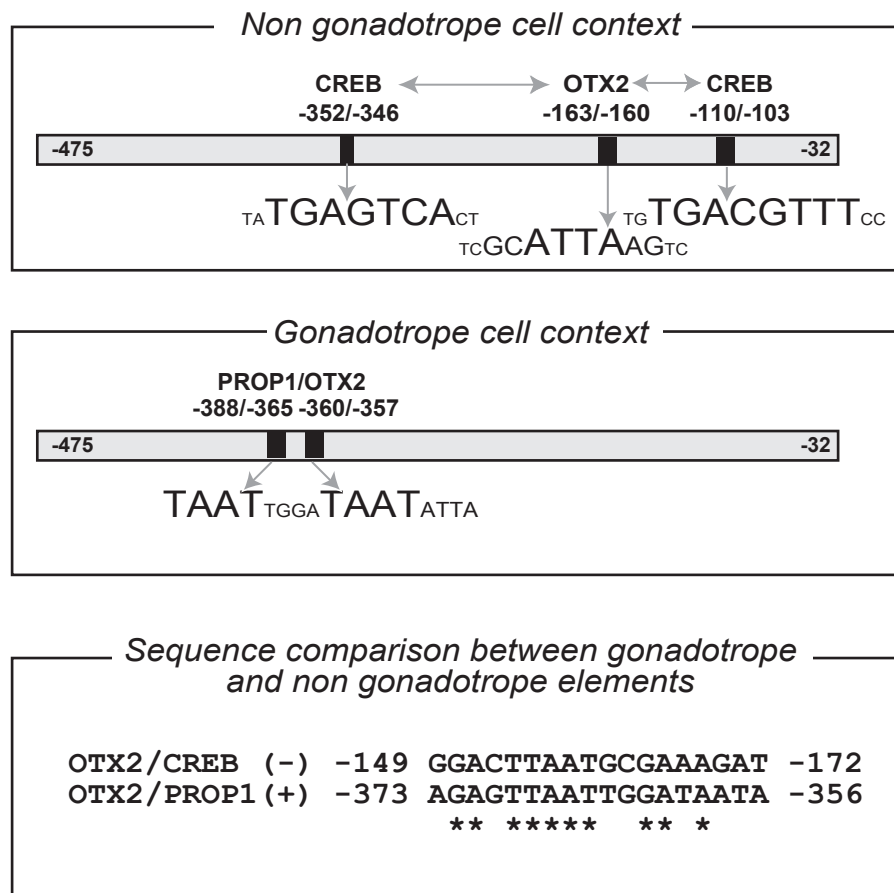


Figure 6

**Table 1 – Sequences of sense and anti-sense primers used for TAAT targeted mutation.**

<i><b>Primer name</b></i>	<i><b>Sequence</b></i>
Luc-S	5 'CTAACATACGCTCTCCATCA 3 '
Luc-A	5 'CTTCCAGCGGATAGAATGGC 3 '
TAAT1m-S	5 'AAACAACAGGTTTCTGCTTGGATCAGGATT 3 '
TAAT1m-A	5 'TGATCCAAGCAGAAACCTGTTGTTTGGTGA 3 '
TAAT2m-S	5 'TGCTTGGATAATATTATGAGTCACTTTTAACT 3 '
TAAT2m-A	5 'GACTCATAATATTATCCAAGCAACTCTAACGA 3 '
TAAT3m-S	5 'TAATTGGATGTTATTATGAGTCACTTTTAACT 3 '
TAAT3m-A	5 'GACTCATAATAACATCCAATTA ACTCTAACGA 3 '
TAAT4m-S	5 'TAATTGGATAATAGCATGAGTCACTTTTAACT 3 '
TAAT4m-A	5 'GACTCATGCTATTATCCAATTA ACTCTAACGA 3 '

**Table 2 – Sequence of primers used in RT-PCR experiments.**

<b>Target cDNA</b>	<b>Amplicon size</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>NCBI accession number</b>
<i>Gnrh</i>	168 bp	5' CCAGCACTGGTCCTATGGGT 3'	5' AGAGCTCCTCGCAGATCCCT 3'	NM_012767
<i>Gnrhr</i> (E1-E2)	220 bp	5' CAGCCCTTAGCTGTCCAAAG 3'	5' GGCAGCTGAAGGTGAAAAAG 3'	NM_031038
<i>Gnrhr</i> (E2-E3)	244 bp	5' TCAGCTGCCTGTTTCATCATC 3'	5' AACATTTCCGGATCAAACCA 3'	NM_031038
<i>Creb</i>	132 bp	5' GGTGCCAAGGATTGAAGAAG 3'	5' ATTGCTCCTCCCTGGGTAAT 3'	NM_134443
<i>cFos</i>	129 bp	5' GGGAGTGGTGAAGACCATGT 3'	5' GCTGCAGCCATCTTATTCCT 3'	NM_022197
<i>Nur77</i>	194 bp	5' TGTGCTAGAGTCCGCCTTT 3'	5' AGGAACATCAACACCCAAGC 3'	NM_024388
<i>Sf1</i>	187 bp	5' TTACACGTGCACCGAGAGTC 3'	5' TGCTTTCTTCTGCTGCTTCA 3'	NM_001191099
<i>Isl1</i>	207 bp	5' AGTCCGGAGAGACATGATGG 3'	5' ATCTGGGAGCTGAGAGGACA 3'	NM_017339
<i>Lhx3</i>	213 bp	5' AGTCCGACAAGGACAGCATC 3'	5' GCAGCTCTCGAAACTGCTCT 3'	XM_001059910
<i>Prop1</i>	153 bp	5' GACAGCTGGAGTCAGCCTTT 3'	5' GGAGTAGTGACCGCTCTTGC 3'	NM_153627
<i>Otx1</i>	177 bp	5' ACCTCAAACAACCCCATAC 3'	5' GGTAGCGAGTCTTTGCGAAC 3'	NM_013109
<i>Otx2</i>	250 bp	5' GCACAACTTGACGTTCTGGA 3'	5' ACTGGCCACTTGTTCCACTC 3'	NM_001100566

#### **4. Article 4 : Reporter transgenic mouse models highlight the dual endocrine and neural facet of GnRH receptor function.**

**Ann N Y Acad Sci. (2011) 1220:16-22**

**Schang AL, Counis R, Magre S, Bleux C, Granger A, Ngô-Muller V, Chenut MC, Ishaq M, Cohen-Tannoudji J, Laverrière JN**

---

Nous avons ici entrepris de présenter les différents modèles transgéniques créés en plaçant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du *Rgnrh* (évoqués précédemment § III / 2.5). Ces données, complétées par des observations récentes réalisées au laboratoire, permettent de mettre en lumière le double aspect endocrine et nerveux que revêtent les fonctions du RGNRH. L'aspect endocrine est illustré par l'étude de l'hypophyse et des gonades, tandis que l'aspect nerveux est abordé via l'étude de l'hippocampe ainsi que d'un nouveau site d'activité du promoteur du *Rgnrh*, la voie oculomotrice constituée par les noyaux oculomoteurs (III) et les nerfs qui en émergent. Cette étude a notamment permis de faire le bilan des avantages et des limites propres à chaque modèle. Concernant le modèle *Rgnrh-hPLAP* créé au laboratoire, ces aspects sont réexaminés et développés dans le § 2.4 de la partie « VI-Discussion ».

## ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

Issue: *Trends in Neuroendocrinology***Reporter transgenic mouse models highlight the dual endocrine and neural facet of GnRH receptor function**Anne-Laure Schang,<sup>1</sup> Raymond Counis,<sup>1</sup> Solange Magre,<sup>1</sup> Christian Bleux,<sup>1</sup> Anne Granger,<sup>2</sup> Valérie Ngô-Muller,<sup>1</sup> Marie-Claude Chenut,<sup>1</sup> Muhammad Ishaq,<sup>1</sup> Joelle Cohen-Tannoudji,<sup>1</sup> and Jean-Noël Laverrière<sup>1</sup><sup>1</sup>Université Paris-Diderot Paris 7, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Paris, France.<sup>2</sup>Division of Endocrinology, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania

Address for correspondence: Anne-Laure Schang, Université Paris-Diderot Paris 7, EAC-CNRS 4413, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Bâtiment Buffon, case courrier 7007, 4 rue Marie-Andrée-Lagroua-Weill-Hallé, 75205 Paris cedex 13, France. anne-laure.schang@univ-paris-diderot.fr

In the pituitary of mammals, the GnRH receptor (GnRHR) plays crucial roles in the neuroendocrine control of reproductive function. This receptor is specifically expressed by the gonadotrope cells scattered among the five other endocrine cell types constituting the anterior pituitary; it is also expressed in other organs, such as the gonads and brain where its function is not well defined. To gain insight into GnRHR function, distribution, and regulation, several transgenic approaches have been developed using a range of reporter genes under the control of the mouse, rat, or ovine GnRHR gene (*Gnrhr*) promoters. Comprehensive reviews of the literature, together with recent results obtained in our laboratory, illustrate how these transgenic models highlight the endocrine as well as the neural facet of GnRHR function. In this review, the endocrine aspect will be discussed with regard to the pituitary and gonad function, whereas the neural aspect will be discussed with regard to hippocampal formation and the oculomotor pathway, the latter constituting an unpreviously described site of *Gnrhr* promoter activity. These approaches should help elucidate the properties of the mammalian GnRH system.

**Keywords:** neuroendocrinology; GnRH receptor; transgenic mouse; promoter activity

**Introduction**

In mammals, the type I GnRH receptor (GnRHR) mediates the neuroendocrine control of reproductive function in the gonadotrope cells of the anterior pituitary by converting the pulsatile GnRH signals originating from the hypothalamus into a coordinated synthesis and secretion of the two gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), which, in turn, regulate multiple gonadal functions, including folliculogenesis, ovulation, spermatogenesis, and steroidogenesis. Binding of GnRH to its G protein-coupled receptor initiates a wide array of signaling events, mainly through the  $G\alpha_q/11$ -phospholipase C $\beta$  pathway, leading to a rapid increase in diacylglycerol and inositol 1,4,5-triphosphate that induce protein kinase C acti-

vation and intracellular calcium mobilization, respectively. The propagation of these signaling cascades accounts for many of the biological effects of GnRH.<sup>1–3</sup>

Besides, the GnRHR gene (*Gnrhr*) is further expressed in several extrapituitary sites including the spinal cord, endometrium, human placenta, lymphocytes, breast, and prostate.<sup>4–7</sup> The most documented sites of *Gnrhr* expression outside the pituitary are the gonads and the brain, especially the hippocampus and other related limbic structures, such as the amygdala.<sup>8–13</sup> The presence of GnRHR in the brain has indeed been reported by several investigators using two different approaches, namely *in situ* hybridization and ligand binding assays.<sup>11–13</sup> Despite accumulating evidence for *Gnrhr* expression both in the gonads and the brain, the roles played by GnRH are still poorly defined.<sup>14,15</sup>

doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05886.x

The study of GnRHR physiology and distribution encounters two main obstacles. The first is the heterogeneity of the anterior pituitary, which contains six endocrine cell types with only few (10–15%) scattered gonadotrope cells. Therefore, *in vivo* exploration of gonadotrope function is rather complex to interpret, leading investigators to favor the use of *in vitro* homogeneous cell models, such as the  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 gonadotrope tumor-derived cell lines.<sup>16,17</sup> The second difficulty is the lack of reliable antibodies to define the spatiotemporal distribution of the receptor and evaluate its expression level. In this context, mouse transgenic models bearing reporter genes have provided alternative attractive tools. Regarding the GnRHR, a rather small number of models have been developed which used different reporter genes driven by *Gnrhr* promoters from three mammalian species. Two of these studies were initiated using the luciferase reporter gene under the control of the mouse (1.9 kb) and ovine (9 or 2.7 kb) 5' flanking regions of the *Gnrhr*.<sup>18,19</sup> In our laboratory, we have created transgenic mice expressing the human placental alkaline phosphatase (hPLAP) driven by the 3.3 or 1.1 kb rat *Gnrhr* promoter to monitor promoter activity *in vivo* in the developing as well as adult animal.<sup>20</sup> More recently, an elegant binary genetic approach based on the specificity of *Gnrhr* expression has been developed to direct high level of the yellow fluorescent protein (YFP) in gonadotrope cells.<sup>21</sup> All these models offer complementary insights into GnRHR physiology and distribution. Data obtained using these transgenic mice as well as recent results from our laboratory highlight the dual endocrine and neural facet of GnRHR function. We will here illustrate the endocrine side with special focus on pituitary and gonads, whereas the neural aspect will be dedicated to the analysis of two brain structures, the hippocampal formation and the oculomotor pathway. The former of these brain structures is an already known site of extrapituitary *Gnrhr* expression, whereas the latter is a novel one.

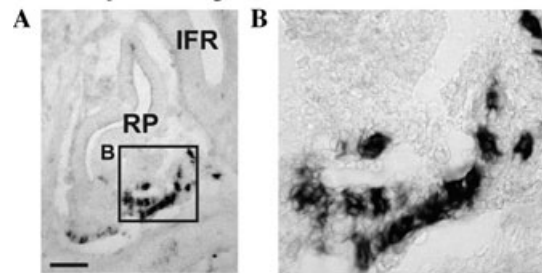
### Endocrine functions of the GnRHR

#### *Transgene expression in the adult pituitary gland*

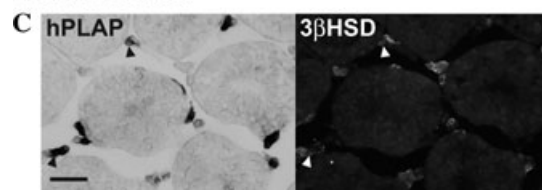
The anterior pituitary is undoubtedly the most documented site of GnRHR expression and function<sup>1</sup> and thus constitutes the most reliable site arguing for the specificity of promoter activity in the above

cited transgenic models. In this regard, the 1.9 kb mouse promoter directed high reporter gene expression in the pituitary as attested by luciferase assay in cellular lysates of both 30- to 35-day-old males and females.<sup>18</sup> Similar results were obtained using the 9 and 2.7 kb ovine promoters with significantly higher luciferase expression in females than males in adult mice.<sup>19</sup> As gonadotropes are the only pituitary cells harboring GnRHRs, the alteration of pituitary luciferase activity in both models after GnRH antiserum treatment provided indirect evidence for gonadotrope-specific transgene expression. Given the high sensitivity and resolution of hPLAP detection, we have further improved analysis of rat *Gnrhr* promoter activity at the single cell level using our transgenic model. Indeed, immunocytochemical analyses performed on pituitary sections of these mice unambiguously demonstrated that the 3.3 kb rat promoter directs reporter gene expression specifically in LH $\beta$  and FSH $\beta$  but not in thyroid-stimulating hormone  $\beta$  subunit or growth hormone immunofluorescent cells.<sup>20</sup> The 1.1 kb rat promoter was shown to be sufficient to direct pituitary transgene expression in a cell-specific manner as observed with its larger counterpart. Very similar data were obtained with a recently developed double knock-in mice model. In this binary genetic approach, the Cre-recombinase was inserted into the *Gnrhr* locus whereas the YFP reporter gene, preceded by a floxed stop signal, was inserted into the ubiquitously expressed ROSA26 locus.<sup>21</sup> The Cre-mediated excision of the stop signal led to a constitutive YFP expression in about 15% cells of the male anterior pituitary. Furthermore, the fluorescent signal was only colocalized with LH $\beta$  and/or FSH $\beta$  subunits as demonstrated by immunohistochemistry. Hence, the models developed to date indicate that mouse, ovine, or rat *Gnrhr* promoters all lead to reporter gene expression in the pituitary with direct or indirect evidence for gonadotrope-specific expression. They have brought valuable information on the physiological regulation of pituitary *Gnrhr* promoter. For example, the regulatory role of GnRH or estradiol *in vivo* was evidenced by pharmacological treatments of luciferase-expressing mice.<sup>18,19</sup> Moreover, YFP mice have allowed single-cell analysis on living cells that have revealed unexpected heterogeneity in the resting properties of gonadotrope cells as well as in their secretory, electrophysiological, and calcium responses to GnRH.<sup>21</sup>

### E13.5 pituitary



### Adult testis



**Figure 1.** Rat *Gnhr* promoter activity in endocrine tissues. Mouse heads and testis from 3.3 kb rat *Gnhr* promoter-hPLAP male mice<sup>20</sup> were fixed in 4% and 2% paraformaldehyde, respectively. Mouse heads were dehydrated in alcohol and toluene, embedded in paraffin wax, sectioned at 14  $\mu$ m thickness, and mounted onto slides and rehydrated. Testis samples were frozen according to previously described procedures,<sup>20</sup> and 16  $\mu$ m cryostat sections were mounted onto slides. Both paraffin and frozen sections were heated at 65°C to inhibit endogenous phosphatases, and incubated with a mixture of chromogenic enzyme substrate containing nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate to reveal transgenic hPLAP activity. The microphotographs were obtained under tungsten illumination. (A) At E13.5, hPLAP staining in the developing pituitary on a sagittal head section, (B) higher magnification of the area framed in A, and (C) transversal section of adult testis: left panel, transgene expression in the interstitial compartment; right panel, immunostaining using 3 $\beta$ -HSD antibody (gift from Dr. P. Robel, Bicêtre, France) revealed with Alexa488-conjugated secondary antibody. Numerous cells in the interstitial compartment are positive for both hPLAP and 3 $\beta$ -HSD (arrow heads). Scale bars: 50  $\mu$ m. IFR = infundibular recess; R = Rathke's pouches.

### Transgene expression in the developing pituitary gland

Careful analysis of rat promoter activity was performed during pituitary development using our transgenic hPLAP mouse model. This revealed that rat *Gnhr* promoter activity can be detected as early as embryonic day (E) 13.5 in the developing anterior pituitary (Fig. 1A and B).<sup>20</sup> Interestingly, this expression was restrained to the rostral-ventral part of the Rathke's pouch thus well correlating with the spatial and temporal emergence of the gonadotrope lineage during pituitary

development.<sup>22</sup> At later stages, stained cells were scattered throughout the anterior pituitary.<sup>20</sup> Thus, based on our data with the rat *Gnhr* promoter-hPLAP transgene, the *Gnhr* obviously represents to date the earliest known marker of the gonadotrope lineage.

### Transgene expression in the gonads

There is strong evidence for the presence of GnRHR on Leydig cells as well as on granulosa and luteal cells. Further, *Gnhr* expression has been previously reported in both the testis and ovary.<sup>8–10,23–27</sup> *In toto* analyses in mouse transgenic animals revealed that the mouse promoter led to a weak and variable testicular luciferase expression, of about 1% of pituitary expression level, whereas no expression was detected in the ovary.<sup>18</sup> Similar data were obtained using the 9 as well as 2.7 kb ovine promoters, both leading to significant higher luciferase expression in the testis than ovary.<sup>19</sup> High sensitivity of our hPLAP model allowed the visualization of rat *Gnhr* promoter activity as early as E12.5 in the developing testis (not illustrated). Further, this expression was maintained during all later stages as well as in the adult, where strong labeling could be detected. Analysis of cellular hPLAP staining revealed that the seminiferous tubules were unstained whereas *Gnhr* promoter was active within the interstitial compartment in cells expressing 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD), an enzyme specifically expressed in Leydig cells (Fig. 1C). However, the transgene was not detected in all 3 $\beta$ -HSD-positive cells suggesting that Leydig cells display some functional heterogeneity as already described for GnRHR expression in gonadotrope cells.<sup>21</sup> Besides, the absence of hPLAP staining in seminiferous tubules is not in agreement with a previous work reporting GnRHR mRNA expression in rodent testicular germ cells.<sup>10</sup> However, in this report, the northern blot data were not clearly demonstrative and the presence of rat GnRHR mRNA in these cells deserves further investigation. An alternative hypothesis to explain such a discrepancy can be proposed based on the comparative analysis of *Gnhr* expression in testis and ovary. Indeed, we did not observe any hPLAP staining in the ovary (not illustrated), as also reported using the mouse and, to a lesser extent, the ovine promoter, suggesting that an alternative *Gnhr* promoter is required in such tissue. Similarly, different promoters may direct *Gnhr* in Leydig versus germinal cells.



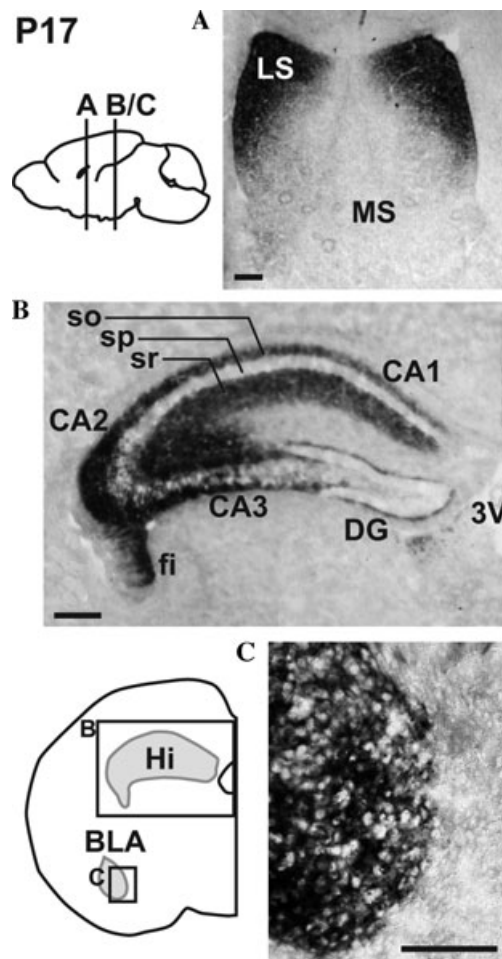
Altogether, this suggests the existence of different cell- or tissue-specific *Gnrhr* promoters.

### Neuronal functions of the GnRHR

The brain is one of the most documented sites of extrapituitary *Gnrhr* expression.<sup>11–13</sup> The 1.9 kb mouse *Gnrhr* promoter induced significant luciferase activity in the whole brain, which was about 10% of the pituitary level. The 9 and 2.7 kb ovine *Gnrhr* promoters also caused high luciferase activity in the mouse brain. In agreement with these data, the 3.3 kb rat *Gnrhr* promoter induced a reliable hPLAP activity in the brain and the high resolution of hPLAP staining has allowed an accurate localization of rat *Gnrhr* promoter activity within specific brain areas as further detailed below.

#### Hippocampal formation

GnRHR expression has been well established in the limbic system.<sup>11–13</sup> Using our transgenic model, we investigated the spatiotemporal pattern of transgene expression in these brain structures. In the adult animal, rat *Gnrhr* promoter activity, that is hPLAP staining, was detected in the limbic system with high intensity in the lateral septum (Fig. 2A), hippocampus (Fig. 2B), and basal amygdaloid nucleus (Fig. 2C).<sup>20</sup> In hippocampus, staining was observed within the Ammon's horn, especially in the strata oriens and radiatum whereas only a faint staining, restricted to the external border of the granular zone, was present in the dentate gyrus (Fig. 2B). The entorhinal cortex also displayed a weak staining (not illustrated). Strong labeled fibers were detected within the fimbria. Interestingly, all these areas were not labeled either during embryonic life or at birth (Schang *et al.*, submitted), thus in strong contrast with pituitary transgene expression that was detected as early as E13.5 (Fig. 1A and B). In addition, we observed a continuous staining between the lateral septum and the hippocampus, which appeared simultaneously in those two limbic structures. Such uninterrupted staining, together with the abundance of labeled fibers all along this pathway, notably in the fimbria, suggested the existence of labeled neuronal projections conveying the reporter molecule. This is consistent with the ability of hPLAP to move through both axonal and dendritic projections.<sup>28</sup>



**Figure 2.** Rat *Gnrhr* promoter activity in the hippocampal formation. Dissected brains from 3.3 kb rat *Gnrhr* promoter-hPLAP male mice at postnatal day 17 (P17) were fixed in 4% paraformaldehyde, and tissue samples were frozen according to previously described procedures.<sup>20</sup> Sixteen micrometers of coronal sections were mounted onto slides and processed as described in the Figure 1 legend. The levels of coronal sections are shown in the upper diagram. The lower diagram represents the most caudal section with the two framed areas corresponding to B and C. Strong hPLAP staining in the (A) lateral septum, (B) hippocampus, and (C) basal amygdaloid nucleus. Scale bars: 200  $\mu$ m. BLA = basal amygdaloid nucleus; CA = Ammon's horn; DG = dentate gyrus; fi = fimbria; Hi = hippocampus; LS = lateral septal nucleus; MS = medial septal nucleus; so = stratum oriens; sp = stratum pyramidale; sr = stratum radiatum; 3V = third ventricle.

#### Oculomotor pathway

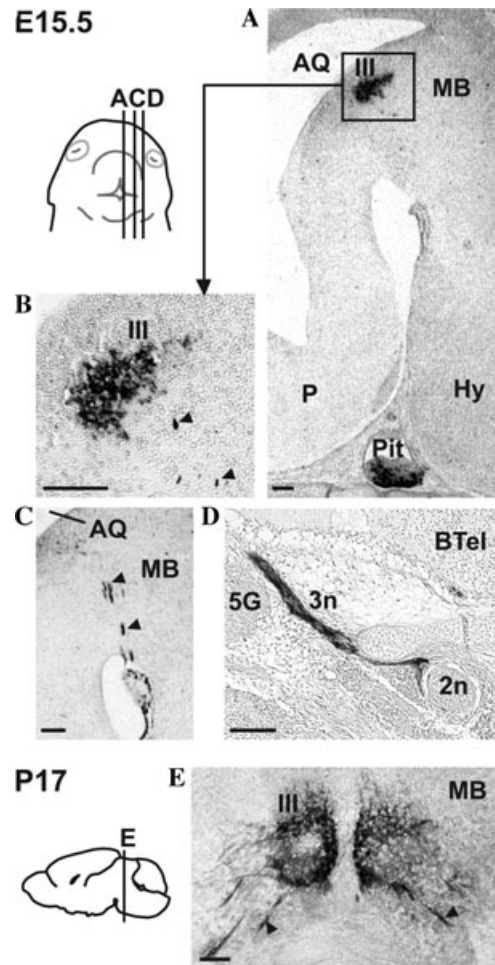
Transgene expression was also repeatedly observed in an unexpected region of the nervous system. Indeed, contrasting with the limbic system, two

symmetric midbrain nuclei displayed high transgene expression as early as E13.5 in the frontal section of the head (not illustrated). At E15.5, hPLAP staining could be tracked all along the pathway, first from those midbrain nuclei (Fig. 3A and B) and then along fibers emerging from them outside of the brain (Fig. 3B and C). Fasciculation of stained fibers appeared to generate nerves extending toward the oculomotor muscles located close to the optic nerves (Fig. 3D). Furthermore, this labeling was maintained after birth (Fig. 3E). Altogether, these observations allowed us to unambiguously identify the labeled midbrain nuclei as the oculomotor nuclei (III) and the nerves emerging from them as the oculomotor nerves (3n). This further illustrates the potent advantage of this model in the analysis of brain GnRHR, notably the ability of hPLAP to label nerve endings by migrating along the nerve fibers.<sup>28</sup>

### Concluding remarks

All the mouse transgenic models generated to date expressing a reporter gene under the direct or indirect control of the *Gnrhr* promoter have allowed the detection and/or quantification of the expression of this transgene, which is properly located in pituitary gonadotrope cells and, hence, likely reflects the activity of the endogenous *Gnrhr*. Given the scarcity of reliable antibodies, these strategies have been very useful to investigate GnRHR properties. Furthermore, the relative weakness of the *Gnrhr* promoter was compensated by the high sensitivity of luciferase or hPLAP detection or by binary genetic strategy uncoupling fluorescence intensity and *Gnrhr* promoter activity. Advantages of each model have been extensively exploited. Indeed, easy quantification of luciferase expression has allowed the study of hormonal regulations of the mouse and ovine *Gnrhr* promoters. Highly sensitive and resolute *in situ* detection of hPLAP was successfully used to assess the precise spatiotemporal distribution of rat *Gnrhr* promoter activity in several brain areas and especially to visualize neuronal pathways, such as the hippocamposeptal and the oculomotor pathways. Finally, single-cell measurements in living gonadotrope cells scattered in heterogeneous pituitary cell cultures was achieved using YFP gonadotrope-expressing mice.

In addition to these transgenic models, two mouse gonadotrope tumor-derived cell lines that



**Figure 3.** Rat *Gnrhr* promoter activity in the oculomotor pathway. Mouse heads (E15.5) or brains (P17) from 3.3 kb rat *Gnrhr* promoter-hPLAP male mice were fixed in 4% paraformaldehyde. Mouse heads were processed as described in the Figure 1 legend, and brains were frozen according to previously described procedures.<sup>20</sup> Fourteen micrometers of sagittal head sections and 16  $\mu$ m of coronal brain sections were processed as described in Figure 1. In each case, the section levels are shown on the corresponding diagram. (A) At E15.5, hPLAP staining in the midbrain oculomotor nucleus and in the ventral developing pituitary gland. (B) Higher magnification of the area framed in A, showing labeled fibers (arrow heads) close to the nucleus. (C) On a slightly more lateral section, labeled fibers running dorso-ventrally through the midbrain and exiting off the brain. (D) The labeled oculomotor nerve extending rostrally toward the muscles located next to the optic nerve. (E) Strong hPLAP staining in the two oculomotor nuclei at P17, as well as in fibers (arrow heads) extending in a lateral-ventral direction. Scale bars: 100  $\mu$ m. AQ = cerebral aqueduct; BTel = basal telencephalon; Hy = hypothalamus; III = oculomotor nucleus; MB = midbrain; P = pons; Pit = pituitary primordium; 2n: optic nerve; 3n = oculomotor nerve; 5G = trigeminal ganglion.

both express the GnRHR, the  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cell lines, have been used as homogeneous cell models to study gonadotrope function.<sup>16,17</sup> Importantly, these cells are useful to decipher the combinations of *cis* and *trans*-regulatory elements involved in cell-specific and hormonal regulation of *Gnrhr* promoter activity. Nevertheless, in contrast to rodents *Gnrhr* promoters,<sup>29–33</sup> the ovine promoter is devoid of functional activity in  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 cells.<sup>19</sup> In addition, there are some reported discrepancies between these cell lines and animal models regarding hormonal regulations of *Gnrhr* promoter activity.<sup>18,19,29</sup> Transgenic mice thus appear to be essential tools for investigating GnRHR properties and gonadotrope function.

### Future directions

Most transgenic strategies described here were developed to overcome the limitations of *in vitro* approaches and further progress into the analysis of *Gnrhr* promoter activity. An additional and less expected benefit of these strategies is a better characterization of the pituitary and extrapituitary sites of *Gnrhr* expression, raising numerous questions about potential new functions of GnRHR during development and in the adult animal. To elucidate these functions, transgenic strategies using site-specific recombinase should now be developed in order to introduce specific *Gnrhr* mutations in the desired cell types and at a specific time point.<sup>34</sup> Such experiments will most certainly help to better understand the function of GnRHR in a given tissue, in addition to its well-known role in the pituitary. These strategies are still mostly restricted to the mouse, for which well-defined embryonic stem cell lines are available. In the near future, however, the development of novel strategies, notably those using repertoires of meganucleases derived from homing endonucleases, should extend the knock-out and knock-in methodologies to any species.<sup>35</sup> New meganucleases may be engineered by local alteration of their binding site resulting in the recognition of any desired sequence close to or within the target gene, such as the *Gnrhr*, thus allowing its efficient recombination. This methodology, by allowing a comparative analysis of *Gnrhr* invalidation in various tissues and different species, should bring new important insights into the role and function of the GnRHR.

Due to their early emergence during evolution, GnRH and GnRHR are widely distributed among animal species from mollusks to humans.<sup>36,37</sup> Three types of GnRH and GnRHR have been characterized so far in invertebrates, agnathans, and fish. In several mammals, such as humans, sheep, and laboratory rodents, only the type I GnRHR has obviously been conserved and may have acquired functions mediated by the two other types of GnRHR in lower vertebrates, especially in the nervous system.<sup>38</sup> Furthermore, the well-characterized action of GnRH as a neurohormone transiting through the blood vessel from the hypothalamus to the pituitary constitutes an ancestral feature of the vertebrates. However, among the jawed vertebrates, the teleost fishes have followed a different evolution. The portal system was lost and direct neural connection developed.<sup>39</sup> In this lineage, GnRH is released by hypothalamic neurons in the immediate vicinity of pituitary cell. In addition, GnRH may act as a paracrine or autocrine factor in extrapituitary sites including the gonads.<sup>14</sup> It might also operate as a neurotransmitter in the brain, being released within the synaptic cleft to activate its postsynaptic receptor.<sup>15</sup> Transgenic mouse models for the study of *Gnrhr* promoter activity may contribute to a better understanding of these fascinating but poorly explored facets of the GnRH system in mammals.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### References

1. Counis, R. *et al.* 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**: 243–254.
2. Millar, R.P. *et al.* 2008. Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol.* **29**: 17–35.
3. Millar, R.P. *et al.* 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr. Rev.* **25**: 235–275.
4. Quintanar, J.L., E. Salinas & R. González. 2009. Gonadotropin-releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats. *Neurosci. Lett.* **461**: 21–24.
5. Harrison, G.S., M.E. Wierman & T.M. Nett. 2004. Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr. Relat. Cancer.* **11**: 725–748.
6. Chen, H.F. *et al.* 1999. Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 743–750.

7. Kottler, M.L. *et al.* 1997. The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int. J. Cancer* **71**: 595–599.
8. Botté, M.C. *et al.* 1998. Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J. Endocrinol.* **159**: 179–189.
9. Moumni, M., M.L. Kottler & R. Counis. 1994. Nucleotide sequence analysis of mRNAs predicts that rat pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptor proteins have identical primary structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1359–1366.
10. Bull, P. *et al.* 2000. Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells. *Mol. Hum. Reprod.* **6**: 582–586.
11. Leblanc, P. *et al.* 1988. Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* **48**: 482–488.
12. Ban, E. *et al.* 1990. GnRH receptors in rat brain, pituitary and testis; modulation following surgical and gonadotropin-releasing hormone agonist-induced castration. *Mol. Cell. Endocrinol.* **26**: 1099–1107.
13. Jennes, L. *et al.* 1997. Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**: 475–490.
14. Leung, P.C. & G.L. Steele. 1992. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr. Rev.* **13**: 476–498.
15. Skinner, D.C., A.J. Albertson & A. Navratil. 2009. Effects of gonadotrophin-releasing hormone outside the hypothalamic-pituitary-reproductive axis. *J. Neuroendocrinol.* **21**: 282–292.
16. Windle, J.J., R.I. Weiner & P.L. Mellon. 1990. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **4**: 597–603.
17. Turgeon, J.L. *et al.* 1996. Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol. Endocrinol.* **10**: 439–450.
18. McCue, J.M. *et al.* 1997. Expression of a murine gonadotropin-releasing hormone receptor-luciferase fusion gene in transgenic mice is diminished by immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **138**: 3154–3160.
19. Duval, D.L. *et al.* 2000. Responsiveness of the ovine gonadotropin-releasing hormone receptor gene to estradiol and gonadotropin-releasing hormone is not detectable *in vitro* but is revealed in transgenic mice. *Endocrinology* **141**: 1001–1010.
20. Granger, A. *et al.* 2004. The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* **145**: 983–993.
21. Wen, S. *et al.* 2008. Functional characterization of genetically labeled gonadotropes. *Endocrinology* **149**: 2701–2711.
22. Zhu, X., A.S. Gleiberman & M.G. Rosenfeld. 2007. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol. Rev.* **87**: 933–963.
23. Clayton, R.N., J.P. Harwood & K.J. Catt. 1979. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* **282**: 90–92.
24. Clayton, R.N. *et al.* 1980. Direct inhibition of testicular function by gonadotropin-releasing hormone: mediation by specific gonadotropin-releasing hormone receptors in interstitial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4459–4463.
25. Lefebvre, F.A. *et al.* 1980. Specific binding of a potent LHRH agonist in rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **20**: 127–134.
26. Reeves, J.J. *et al.* 1980. Similar luteinizing hormone-releasing hormone binding sites in rat anterior pituitary and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 5567–5571.
27. Sharpe, R.M. & H.M. Fraser. 1980. Leydig cell receptors for luteinizing hormone releasing hormone and its agonists and their modulation by administration or deprivation of the releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 256–262.
28. Badaloni, A. *et al.* 2007. Transgenic mice expressing a dual, CRE-inducible reporter for the analysis of axon guidance and synaptogenesis. *Genesis* **45**: 405–412.
29. Albarracin, C.T., U.B. Kaiser & W.W. Chin. 1994. Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Endocrinology* **135**: 2300–2306.
30. Clay, C.M. *et al.* 1995. Cell-specific expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is conferred by elements residing within 500 bp of proximal 5' flanking region. *Endocrine* **3**: 615–622.
31. Cherrington, B.D. *et al.* 2008. NeuroD1 and Mash1 temporally regulate GnRH receptor gene expression in immortalized mouse gonadotrope cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **295**: 106–114.
32. Pincas, H. *et al.* 1998. Multiple elements in the distal part of the 1.2 kb 5'-flanking region of the rat GnRH receptor gene regulate gonadotrope-specific expression conferred by proximal domain. *Mol. Cell Endocrinol.* **144**: 95–108.
33. Pincas, H. *et al.* 2001. Proximal cis-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* **15**: 319–337.
34. Tronche, F. *et al.* 2002. When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett.* **529**: 116–121.
35. Grizot, S. *et al.* 2010. Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Res.* **38**: 2006–2018.
36. Gorbman, A. & S.A. Sower. 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (metazoan) biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* **134**: 207–213.
37. Kah, O., C. Lethimonier & G. Somoza. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* **153**: 346–364.
38. Stewart, A.J. *et al.* 2009. Retention and silencing of prepro-GnRH-II and type II GnRH receptor genes in mammals. *Neuroendocrinology* **90**: 416–432.
39. Lovejoy, D.A. 2006. Elaboration of neuroendocrine systems. In *Neuroendocrinology: An Integrated Approach*. John Wiley & Sons. Chichester, England. 85–117.

## VI. DISCUSSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons abordé l'expression de récepteur de la GnRH sous plusieurs aspects. Nous avons exploré les mécanismes qui sous-tendent l'expression de ce gène dans l'hypophyse et plus particulièrement dans les cellules gonadotropes en analysant cette combinatoire transcriptionnelle qui regroupe plusieurs facteurs impliqués dans l'ontogenèse hypophysaire. Il ressort de cette étude que cette combinatoire présente une caractéristique majeure : sa robustesse fondée sur une redondance fonctionnelle, que ce soit au niveau des facteurs de transcription ou des éléments cis-activateurs. L'étude des autres tissus exprimant le récepteur, hippocampe, rétine, pinéale, démontre que cette combinatoire évolue d'un tissu à l'autre, voire d'un stage de développement à un autre en mariant des acteurs communs comme les facteurs LIM-HD ou le facteur OTX2 à des partenaires différents ou nouveaux, agissant par l'intermédiaire d'éléments cis-activateurs ciblés. Si la fonction et le rôle du récepteur hypophysaire font l'objet d'études approfondies et fort nombreuses, c'est loin d'être le cas dans les autres tissus, notamment l'hippocampe. Nous verrons pourtant que les perspectives qu'offre l'étude approfondie du récepteur dans ces sites extra-hypophysaires pourraient avoir un impact physiologique et physiopathologique considérable.

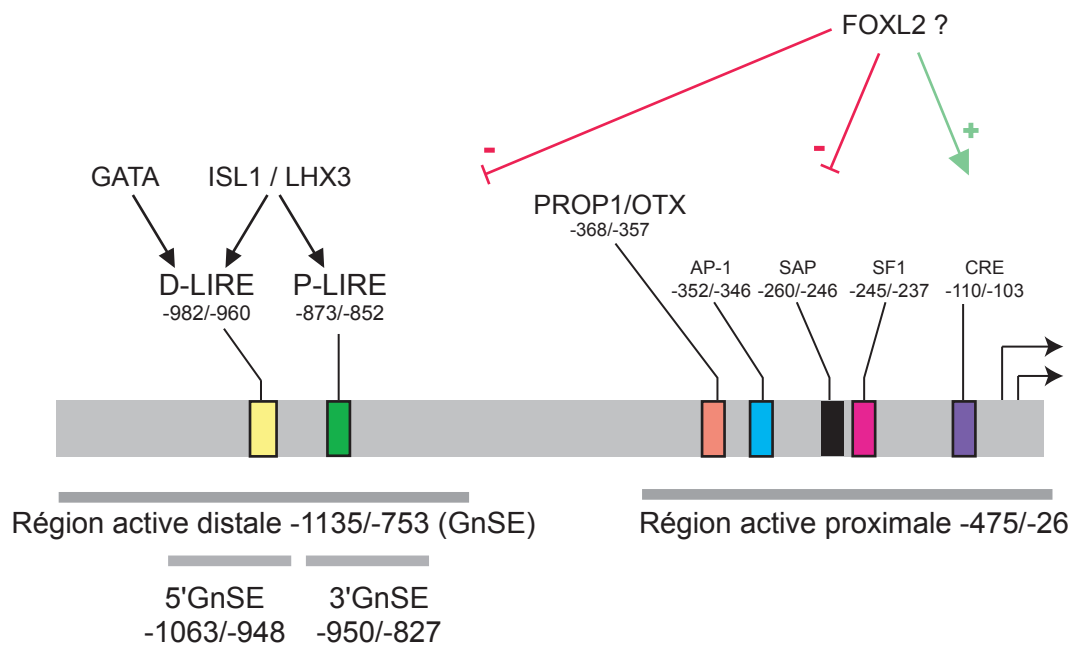
### 1. Régulation du gène du *Rgnrh* dans l'hypophyse

#### 1.1 Les apports de l'ontogenèse hypophysaire

La connaissance des mécanismes régulant l'ontogenèse hypophysaire permet d'émettre des hypothèses quant à l'identité des facteurs qui participent à l'initiation et/ou au maintien de l'expression des gènes marqueurs des lignages hypophysaires. Parmi les facteurs engagés dans la différenciation précoce ou terminale du lignage gonadotrope, deux sous-catégories de facteurs à homéodomaine, de type LIM et Paired-like, semblent jouer un rôle prépondérant. Parmi les autres facteurs de différenciation gonadotrope, nos résultats suggèrent que les facteurs GATA sont impliqués dans la régulation de l'expression du *Rgnrh*. D'autre part, le cas de SF1 soulève plusieurs questions relatives aux mécanismes qui sous-tendent l'émergence du lignage gonadotrope. La **figure 13** résume et réactualise les différents éléments de la combinatoire transcriptionnelle impliquée dans l'expression du *Rgnrh* de rat dans les cellules gonadotropes.

##### 1.1.1. Les protéines LIM à homéodomaine

Exprimées très tôt au cours de l'ontogenèse hypophysaire, ISL1 et LHX3 sont indispensables au développement précoce de la poche de Rathke (voir § III / 2.4.4.a). En outre, des effets de ces

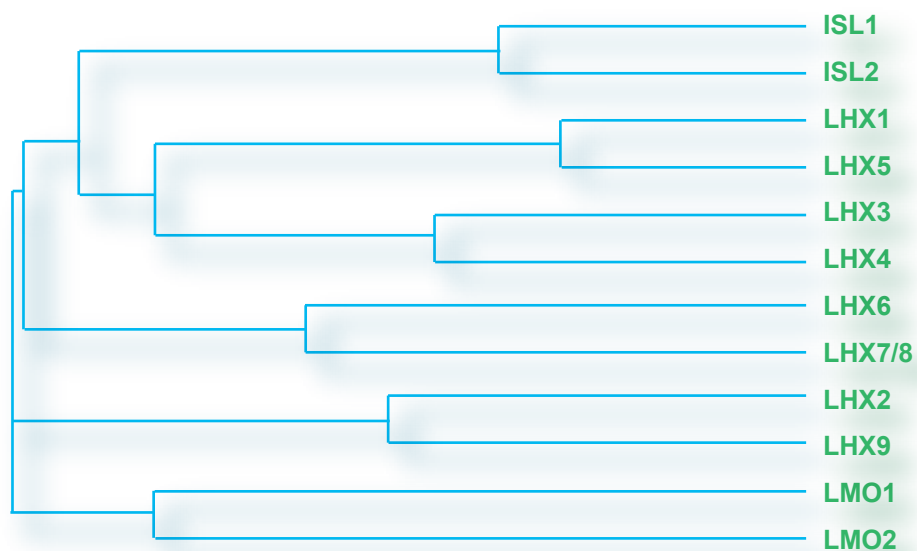


**Figure 13 :**  
**Bilan des éléments caractérisés ou en cours d'étude sur le promoteur du *Rgnrh* de rat dans les cellules gonadotropes**

Dans la région proximale, un élément de réponse aux facteurs Paired-like PROP1 et OTX1/2 a été identifié en position -368/-357. Dans l'enhancer distal, l'élément D-LIRE semble être la cible à la fois des protéines LIM à homéodomaine ISL1 et LHX3, et de facteurs GATA. Le facteur Forkhead FOXL2 exerce un effet activateur sur la région très proximale du promoteur, alors qu'il induit une inhibition de l'activité du promoteur de 1,1 kb (figure 15).

facteurs sur l'expression de plusieurs gènes marqueurs des lignages hypophysaires ont pu être mis en évidence, parmi lesquels figurent les gènes codant PIT1, l' $\alpha$ GSU, la PRL, la TSH $\beta$  et le RGnRH. Dans le promoteur de rat, nous avons pu caractériser un nouvel élément de réponse pour ces facteurs, en plus de l'élément LIRE déjà identifié (voir V-1.Article 1). Ce second élément a été nommé D-LIRE en raison de sa localisation distale par rapport au premier élément plus proximal, qui a été rebaptisé P-LIRE. Ces deux éléments, comportant chacun 2 motifs TAAT, sont situés sur l'enhancer distal du promoteur (GnSE). Dans les cellules gonadotropes  $\alpha$ T3-1, des multimères de l'élément D-LIRE placés en amont d'un promoteur minimal ont une activité promotrice proportionnelle au nombre d'éléments présents. En outre, l'activité de l'élément D-LIRE dépend de l'intégrité des 2 motifs TAAT. Dans ces cellules, la cotransfection d'un dominant négatif de LHX3 (KRAB-LHX3) diminue fortement l'activité des éléments D-LIRE, suggérant une implication du facteur LHX3 endogène dans l'activation de cette séquence. Cotransfectés dans les cellules hétérologues CHO (Chinese Hamster Ovary), les facteurs ISL1 et LHX3 sont en outre capables d'activer spécifiquement l'élément D-LIRE *via* les motifs TAAT. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis d'établir que les facteurs ISL1 et LHX3 interagissent *in vivo* avec le promoteur du *Rgnrh* murin dans les cellules  $\alpha$ T3-1, dans la région du P-LIRE, relativement proche du site d'initiation de la transcription, mais également, dans une moindre mesure, au niveau du D-LIRE, dont la séquence est hautement conservée entre le rat et la souris. Cette observation suggère que le P-LIRE de souris, initialement caractérisé comme élément de réponse pour LHX3 (McGillivray *et al.*, 2005), constitue une cible de l'hétérodimère ISL1/LHX3 à l'image de l'élément P-LIRE de rat caractérisé au laboratoire (Granger *et al.*, 2006).

Le facteur LHX4 présente une homologie de séquence élevée avec LHX3, qui est maximale dans les domaines LIM et l'homéodomaine, indiquant que ces deux facteurs ont divergé relativement récemment au cours de l'évolution (**Figure 14** ; pour revue : Mullen *et al.*, 2007). Ce facteur est exprimé dès E9,5 dans la poche de Rathke mais, contrairement à LHX3, cette expression diminue fortement vers E15,5. L'inactivation de *Lhx4* chez la souris conduit à une létalité néonatale, essentiellement due à un défaut de maturation pulmonaire. Le développement hypophysaire, moins affecté que chez les souris *Lhx3*<sup>-/-</sup>, est caractérisé par une mort cellulaire accrue conduisant à une hypophyse hypoplasique, dans laquelle la plupart des types cellulaires parviennent néanmoins à se différencier (Raetzman *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que LHX3 et LHX4 jouent des rôles distincts dans l'organogenèse hypophysaire. Cependant, la double invalidation de ces facteurs, générant un phénotype hypophysaire plus sévère que les simples mutants, démontre une redondance fonctionnelle partielle entre LHX3 et LHX4 dans la formation et la croissance de la poche de Rathke (Sheng *et al.*, 1997). Outre ISL1, LHX3 et LHX4, l'implication dans le développement hypophysaire d'un quatrième facteur LIM-HD, LHX2, a été évaluée récemment par création d'un modèle murin *Lhx2*<sup>-/-</sup> (Zhao *et al.*, 2010). Les embryons mutants présentent de graves troubles du développement de l'infundibulum et de l'hypophyse postérieure, mais la poche de Rathke se met en place et tous les lignages anté-hypophysaires parviennent à se différencier. En revanche, la forme et l'organisation de la poche de Rathke sont sévèrement altérées en répercussion des atteintes du développement de l'infundibulum et de l'hypophyse postérieure. D'après cette étude, LHX2 ne semble pas jouer de rôle direct dans la différenciation de l'hypophyse antérieure chez la souris. Cependant, un rôle répresseur



**Figure 14 :**  
**Cladogramme des facteurs LIM murins**

Le cladogramme a été réalisé à partir des séquences protéiques des facteurs LIM à homéodomaine (ISL/LHX) et LIM Only (LMO) de souris. Les comparaisons de séquences et le cladogramme ont été réalisés à partir du programme ClustalW2 fourni par le European Bioinformatics Institute à l'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Ainsi, ce schéma montre, par exemple, que parmi l'ensemble des protéines LIM testées ISL1 présente la plus forte homologie de séquence avec ISL2, LHX3 avec LH4, ou encore LMO1 avec LMO2. A l'inverse, ISL1 et 2 s'avèrent peu homologues à LHX2 et 9 et plus proches de LHX3 et 4. Les protéines dont les séquences sont relativement homologues jouent souvent des rôles redondants, comme ISL1 et ISL2 ou LHX3 et 4.



de ce facteur a été mis en évidence *in vitro* sur l'activité du promoteur du gène de l' $\alpha$ GSU porcine (Susa *et al.*, 2006). Cette contradiction apparente entre les résultats obtenus chez le porc et la souris pourrait refléter des différences interspécifiques ou encore l'existence d'un mécanisme compensant l'invalidation de *Lhx2* dans l'hypophyse antérieure chez la souris. En outre, l'hypothèse d'un rôle de LHX2 dans l'ontogenèse anté-hypophysaire est soutenue par l'analyse du transcriptome de la lignée  $\alpha$ T3-1 réalisée au laboratoire par puce affymetrix, qui a révélé un niveau d'expression élevé de LHX2 dans ces cellules.

Afin d'évaluer la spécificité de l'effet du couple ISL1/LHX3 sur l'élément D-LIRE, nous avons remplacé l'un des deux partenaires par un autre facteur de la même famille au cours d'expériences de cotransfections dans la lignée  $\alpha$ T3-1 (voir V-1.Article 1). Le facteur ISL2, qui est étroitement apparenté à ISL1, est aussi efficace que ce dernier pour activer D-LIRE en association avec LHX3. Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant l'expression d'ISL2 dans l'hypophyse de Mammifère, laissant en suspens l'hypothèse d'un rôle de ce facteur dans la régulation de l'expression hypophysaire du *Rgnrh* *in vivo*. Le facteur LHX4, presque indétectable dans l'hypophyse dès E15,5, n'a pas encore été testé mais il est fort probable qu'il puisse se substituer à LHX3 *in vitro* étant donné leur forte homologie de séquence et leur action partiellement redondante dans la mise en place de la poche de Rathke (Sheng *et al.*, 1997, Ellsworth *et al.*, 2006). En revanche, les facteurs LHX5 et LHX9 n'ont pas d'effet significatif sur l'activité de D-LIRE en association avec ISL1, démontrant une spécificité d'action du couple ISL1/LHX3 sur D-LIRE, comme cela avait déjà été observé pour l'élément P-LIRE (Granger *et al.*, 2006). Cependant, compte tenu du niveau d'expression élevé de LHX2 dans les cellules  $\alpha$ T3-1 ainsi que de son rôle régulateur de l'expression de l' $\alpha$ GSU porcine, nous avons entrepris d'évaluer ses effets sur la régulation de l'expression du *Rgnrh*, en particulier sur l'activité des éléments LIRE. Nos résultats préliminaires semblent indiquer une efficacité faible de ce facteur, à l'image de LHX9 auquel il est étroitement apparenté (**Figure 14**), confortant la notion de spécificité d'action du dimère ISL1/LHX3.

### 1.1.2. FOXL2, une cible de LHX3

FOXL2 est un facteur de transcription à domaine Forkhead, dont le gène a été identifié par clonage positionnel chez des patients atteints du syndrome blépharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus ou BPES (Crisponi *et al.*, 2001). Ce syndrome se caractérise essentiellement par une atteinte du développement des paupières, isolé (type II) ou associé à une insuffisance ovarienne prématurée (type I). Dans l'ovaire, FOXL2 participerait notamment à la régulation du cycle cellulaire et à la réponse au stress oxydatif, régulations dont les défaillances pourraient jouer un rôle central dans le vieillissement ovarien et le développement de cancers (Benayoun *et al.*, 2011). Au cours du développement, FOXL2 est également exprimé ventralement dans le promordium hypophysaire dès E11,5, où son transcrit est détecté dès E10,5 (Treier *et al.*, 1998, Ellsworth *et al.*, 2006). Cette expression est maintenue chez l'adulte dans les lignages gonadotrope et thyroïdienne (Ellsworth *et al.*, 2006). En revanche, FOXL2 est totalement absent du primordium hypophysaire chez les souris

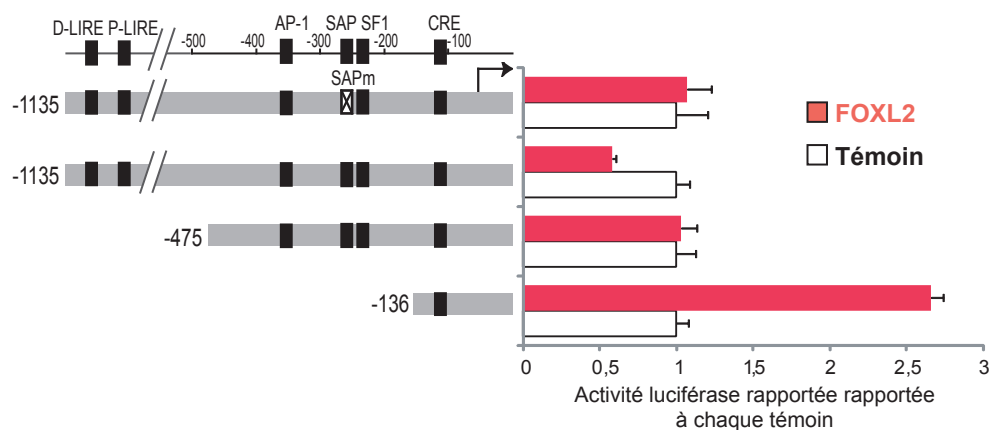
*Lhx3*<sup>-/-</sup>, alors que son expression est seulement réduite dans le modèle *Lhx4*<sup>-/-</sup> (Ellsworth *et al.*, 2006), démontrant que le gène codant FOXL2 est soumis à une régulation, directe ou indirecte, par ces facteurs LIM-HD dans le primordium hypophysaire. D'autre part, plusieurs cibles hypophysaires de FOXL2 ont été identifiées. Ainsi, FOXL2 est capable de réguler l'expression du gène de l' $\alpha$ GSU (Ellsworth *et al.*, 2006). *In vitro*, FOXL2 régule le promoteur murin de ce gène dans des lignées gonadotropes  $\alpha$ T3-1 et L $\beta$ T2 ainsi que la lignée thyroïdienne  $\alpha$ TSH. En outre, *in vivo*, l'expression ectopique dorsale d'une protéine de fusion FOXL2-VP16, associant FOXL2 au domaine d'activation de la protéine virale VP16, induit une expression ectopique dorsale de l' $\alpha$ GSU. Par ailleurs, l'implication de FOXL2 a été démontrée récemment dans la réponse à l'activine du gène de la FSH $\beta$  (Lamba *et al.*, 2009, Corpuz *et al.*, 2010), à l'image de son effet caractérisé sur l'expression du *Rgnrh* (voir § III / 2.3.1.b ; Ellsworth *et al.*, 2003b).

Nous avons entamé récemment l'analyse des effets potentiels de FOXL2 sur la régulation de l'expression du *Rgnrh* de rat en réalisant des cotransfections transitoires d'un vecteur d'expression codant pour FOXL2 avec une construction luciférase dirigée par le promoteur du *Rgnrh* de rat dans les cellules  $\alpha$ T3-1. La surexpression de FOXL2 induit une augmentation (x 2,7) de l'activité du promoteur de 136 pb, mais n'engendre pas d'effet visible sur le promoteur de 475 pb alors qu'elle inhibe le promoteur de 1135 pb (**Figure 15**). Ces résultats suggèrent que FOXL2 exerce un effet activateur *via* un élément de réponse localisé dans la séquence courte, alors qu'il agirait en tant que répresseur sur un ou plusieurs élément(s) localisé(s) entre -136 et -475, annulant la stimulation induite *via* la séquence proximale. En outre, au moins un élément additionnel localisé entre -475 et -1135 serait impliqué dans l'effet répresseur de FOXL2 sur le promoteur de 1,1 kb. La mutation de l'élément SAP, adjacent au motif SF1, lève partiellement l'inhibition exercée par FOXL2 sur le promoteur long, suggérant que l'élément SAP est impliqué dans l'effet répresseur de FOXL2.

Dans les cellules de la granulosa, FOXL2 régule l'expression de certaines enzymes de la stéroïdogenèse. Parmi celles-ci, ce facteur réprime la transcription du gène codant la 17 $\alpha$ -hydroxylase (*Cyp17*) en inhibant la fixation de SF1 sur le promoteur (Park *et al.*, 2010). Compte tenu de la proximité des sites SAP et SF1 sur le promoteur du *Rgnrh* de rat, l'effet associé à la mutation de SAP pourrait être sous-tendu par une interaction physique et/ou fonctionnelle entre FOXL2 et SF1. Ces données préliminaires doivent être complétées par la caractérisation fine des éléments de réponse pour FOXL2 et ses interactions éventuelles avec SF1 et/ou d'autres facteurs impliqués dans la régulation de l'expression gonadotrope du *Rgnrh*.

### 1.1.3. Les facteurs Paired-like à homéodomaine

Les facteurs PAX (Paired box) possèdent, en plus de leur homéodomaine, un domaine Paired homologue à celui du gène Paired de drosophile. Les facteurs Paired-like à homéodomaine, incluant les facteurs PITX, OTX, PROP1 ou encore HESX1, ne possèdent pas de domaine Paired mais sont regroupés avec les facteurs PAX dans la classe Paired, essentiellement sur la base d'homologies de séquence entre leurs homéodomains.



**Figure 15 : effets de FOXL2 sur le promoteur du *Rgnrh* dans la lignée gonadotrope  $\alpha$ T3-1**

Les cellules  $\alpha$ T3-1 ont été transfectées par les constructions luciférase schématisées en regard de chaque histogramme (150 ng/puits de 1,9 cm<sup>2</sup>) et co-transfectées par les vecteurs d'expression pCMV-FOXL2 (barres rouges) ou par le vecteur d'expression témoin pCMV- $\beta$ Gal (10 ng/puits) (barres blanches). Les résultats de transfection sont systématiquement calculés en termes d'activité luciférase relative en rapportant l'activité luciférase firefly (construction contenant le promoteur d'intérêt) à l'activité luciférase *Renilla* (vecteur témoin de transfection). Les résultats sont la moyenne (barre) de deux expériences indépendantes réalisées en triplet  $\pm$  l'écart-type.

### a. Facteurs PITX

Les facteurs PITX1 et PITX2 sont exprimés dans l'ectoderme oral dès E8,5. Ces facteurs Paired-like à homéodomaine, apparentés à Bicoid (Bicoid Related factors), sont exprimés dans toute la poche de Rathke au cours du développement et sont présents dans la plupart des lignages hypophysaires différenciés (Drouin *et al.*, 1998). Chez l'adulte et dans les lignées immortalisées, ils sont particulièrement abondants dans les cellules thyroïdiques et gonadotropes (Drouin *et al.*, 1998, Charles *et al.*, 2005). L'inactivation de *Pitx1* chez la souris n'a pas d'incidence majeure sur la différenciation précoce de l'hypophyse (Szeto *et al.*, 1999). En revanche, le nombre de cellules thyroïdiques et gonadotropes est réduit, ainsi que les niveaux d'expression des sous-unités FSH $\beta$ , LH $\beta$  et TSH $\beta$ . Inversement, le niveau d'expression de l'ACTH et le nombre de cellules corticotropes sont plus élevés que chez les souris contrôles.

Contrairement à PITX1, PITX2 paraît indispensable aux phases précoces du développement hypophysaire, qui est interrompu très précocement chez les souris *Pitx2*<sup>-/-</sup> (Gage *et al.*, 1999). Afin d'étudier l'effet d'une altération croissante de la dose de PITX2, un allèle hypomorphe pour ce facteur (*Pitx2*<sup>neo</sup>) a été créé (Gage *et al.*, 1999). Les souris *Pitx2*<sup>+/+</sup>, *Pitx2*<sup>neo/neo</sup>, *Pitx2*<sup>neo/-</sup> et *Pitx2*<sup>-/-</sup>, exprimant des doses progressivement décroissantes de PITX2, présentent un défaut de plus en plus sévère de la croissance de la poche de Rathke (Suh *et al.*, 2002). Dans la lignée *Pitx2*<sup>neo/neo</sup>, le développement hypophysaire précoce s'effectue normalement et permet ainsi d'observer les effets de l'allèle hypomorphe sur la différenciation terminale des lignages hypophysaires. Ces souris présentent une forte diminution de l'expression des gènes codant le RGnRH, la LH $\beta$  et la FSH $\beta$ . La mutation hypomorphe *Pitx2*<sup>neo/neo</sup> affecte donc sévèrement la différenciation du lignage gonadotrope, mais également celle des lignages dépendants de PIT1 (somatotrope, lactotrope et thyroïdique) de façon plus modérée. Ce phénotype est corrélé avec une légère diminution de l'expression de PIT1, associée à une chute drastique de l'expression des facteurs de différenciation gonadotrope SF1, EGR1 et GATA2 dans la région ventrale de l'hypophyse antérieure. L'expérience inverse, réalisée par surexpression de PITX2 sous le contrôle du promoteur de l' $\alpha$ GSU, induit une augmentation du nombre de cellules gonadotropes, confirmant le rôle essentiel de PITX2 dans la différenciation terminale de ce lignage (Charles *et al.*, 2005).

De façon intéressante, le développement précoce de l'hypophyse est interrompu chez des doubles mutants *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Pitx2*<sup>neo/neo</sup> contrairement aux simples mutants homozygotes, laissant supposer une redondance fonctionnelle entre les deux facteurs PITX au début du développement hypophysaire. Ainsi, ce processus serait sensible à la dose totale de PITX exprimée dans le primordium hypophysaire. En outre, l'expression de *Lhx3* est abolie dans la poche de Rathke des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Pitx2*<sup>-/-</sup>, contrairement aux simples mutants et aux souris *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Pitx2*<sup>neo/neo</sup>, suggérant que les facteurs PITX agissent de façon redondante en amont de *Lhx3* au début du développement hypophysaire (Charles *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans le lignage gonadotrope, les facteurs PITX participent à la régulation de l'expression des gènes des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des gonadotropines (pour revue : Zhu *et al.*, 2007).

## **b. Facteurs OTX**

Les facteurs de type OTX (OTX1, OTX2 et CRX) sont apparentés aux facteurs PITX et, comme ces derniers, possèdent un homéodomaine de type bicoid. Les gènes codant pour ces facteurs sont des orthologues d'orthodenticle, exprimé dans la tête, les yeux et les antennes de la drosophile au cours du développement. De façon similaire chez la souris, OTX1 et OTX2 sont exprimés dans plusieurs structures nerveuses et sensorielles au cours du développement, incluant le cerveau, le système olfactif, l'oreille et l'œil (Simeone *et al.*, 1993). En outre, OTX1 est exprimé dans l'hypophyse postnatale. Cotransfecté en cellules hétérologues, OTX1 est capable d'activer spécifiquement les promoteurs des gènes de la GH de rat, de l' $\alpha$ GSU murine et des sous-unités  $\beta$  de la LH et de la FSH bovines (Acampora *et al.*, 1998). En outre, les souris *Otx1*<sup>-/-</sup> présentent un retard de croissance et un hypogonadisme transitoires entre la naissance et la puberté, causés par une diminution temporaire de l'expression de la GH, la LH et la FSH sans atteinte de la fonction hypothalamique hypophysiotrope (Acampora *et al.*, 1998). A quatre mois, ces souris présentent un phénotype comparable aux souris témoins, suggérant le recrutement de facteurs de transcription différents sur les promoteurs des gènes de ces hormones en fonction du stade de développement. Contrairement à OTX1, l'invalidation d'OTX2 chez la souris n'est pas viable. Le génotype hétérozygote *Otx2*<sup>+/-</sup> est associé à des troubles variables, pouvant inclure des défauts de développement cérébral et oculaire (Matsuo *et al.*, 1995). Chez l'homme, bien que la majorité des mutations hétérozygotes induisent essentiellement des malformations oculaires, plusieurs mutations d'OTX2 ont été découvertes récemment chez des patients présentant un déficit combiné en hormones hypophysaires, isolé ou associé à une anophtalmie (Diaczok *et al.*, 2008, Tajima *et al.*, 2009, Dateki *et al.*, 2010). En outre, deux cibles moléculaires d'OTX2 dans l'hypophyse ont été identifiées, à savoir les gènes codant les facteurs de transcription HESX1 et PIT1 (Tajima *et al.*, 2009), qui jouent tous deux un rôle crucial dans l'ontogenèse hypophysaire (Zhu *et al.*, 2007). Exprimé transitoirement jusqu'à E12, le répresseur transcriptionnel de type paired-like HESX1 est impliqué dans les étapes très précoces de ce processus, agissant comme un antagoniste de PROP1, qui, à son tour, réprime l'expression de *Hesx1* conjointement avec la  $\beta$ caténine. Ces deux facteurs sont séquentiellement requis dans la régulation de l'expression du facteur PIT1, impliqué dans la spécification des lignages somatotrope, lactotrope et thyrotrope (voir § III / 2.4.3).

## **c. PROP1**

PROP1 est exprimé de façon transitoire dans le primordium hypophysaire. Détectée à E10,5 chez la souris, son expression augmente jusqu'à E12 puis diminue et disparaît vers E15. Comme évoqué précédemment, en formant un complexe avec la  $\beta$ caténine, PROP1 réprimerait la transcription de *Hesx1*, indispensable au développement précoce de la poche de Rathke, et participerait à la détermination des lignages hypophysaires en induisant l'expression de PIT1 (Olson *et al.*, 2006). Sa mutation chez les souris naines Ames induit notamment une diminution de l'expression des gonadotropines (voir § III / 2.4.3 ; Sornson *et al.*, 1996). De plus, le maintien de l'expression de *Prop1* au-delà de sa fenêtre d'expression physiologique retarde la maturation du lignage gonadotrope

(Cushman *et al.*, 2001), ainsi que la survenue de la puberté (Vesper *et al.*, 2006). Chez l'humain, des mutations de *PROP1* ont été décrites chez des patients atteints de déficits combinés en hormones somatotrope, lactotrope et thyroïdienne, généralement associés à un HH plus sévère que chez la souris Ames et parfois à une déficience en hormone corticotrope (Reynaud *et al.*, 2004). En outre, l'expression élevée de *Prop1* dans les lignées gonadotropes murines suggère un rôle de ce facteur dans l'expression initiale des gènes marqueurs du lignage gonadotrope (Aikawa *et al.*, 2006).

#### **d. Rôle des facteurs Paire-like dans l'expression du *Rgnrh***

Le promoteur du *Rgnrh* de rat contient 33 motifs TAAT dans les 1211 pb s'étendant en amont du site ATG d'initiation de la traduction. Ce taux est significativement ( $p < 0,001$ ) plus élevé que les 13 TAAT attendus d'après la richesse en A et T de la séquence. Ceci suggère que certains d'entre eux constituent des éléments fonctionnels en plus de ceux précédemment caractérisés dans le P-LIRE et le D-LIRE (Granger *et al.*, 2006). Compte tenu de cette richesse en TAAT mais également du rôle prépondérant joué par les facteurs à homéodomaine dans la différenciation du lignage gonadotrope, nous avons émis l'hypothèse que ces facteurs pouvaient être impliqués, seuls ou en combinaison, dans la régulation de l'expression du *Rgnrh*. Sur le promoteur de 0,45 kb, seul PROP1 induit une augmentation significative de l'activité promotrice. OTX1 et OTX2, qui n'exercent aucun effet individuel, agissent en synergie avec PROP1 pour stimuler (3x) l'activité promotrice (voir V-3.Article 3). Des mutations ponctuelles de 4 motifs TAAT situés dans la région proximale ont permis de localiser deux TAAT impliqués dans l'effet de ces facteurs, en position -268/-265 et -260/-257. La mutation du premier TAAT (-268/-265) abolit tout effet de ces facteurs y compris de PROP1 seul, suggérant que ce site interagit avec PROP1. La mutation du second motif (-260/-257) entraîne une diminution modérée des effets de PROP1 seul ou associé à OTX1, laissant supposer un rôle de cet élément dans l'effet synergique exercé par OTX1. Dans ces expériences, OTX1 et OTX2 sont interchangeables, suggérant là encore une redondance fonctionnelle entre ces facteurs *in vivo*. Nos données suggèrent pour la première fois une implication directe du facteur OTX2 dans la différenciation terminale et/ou le maintien du lignage gonadotrope. Ainsi, OTX2 pourrait endosser plusieurs fonctions selon le stade de développement hypophysaire, activant *Hesx1* précocement, puis participant à la régulation de *Pit1* et du *Rgnrh* (Tajima *et al.*, 2009). Dans ces deux derniers cas, OTX2 agirait de concert avec PROP1 (Olson *et al.*, 2006), de façon respectivement indépendante ou synergique. Par ailleurs, le rôle d'OTX2 dans la régulation de l'expression du gène de la GnRH a été mis en évidence dans la lignée neuronale GT1-7. Ainsi, dans un même type cellulaire, OTX2 pourrait réguler à la fois l'expression du récepteur et du ligand, et, de cette manière, favoriser un mode d'action autocrine de la GnRH.

#### **1.1.4. Les facteurs GATA**

Chez les Vertébrés, les facteurs GATA constituent un groupe de 6 régulateurs transcriptionnels dont le motif de liaison à l'ADN, contenant deux doigts de zinc, interagit avec la

séquence consensus WGATAR (W = A ou T ; R = A ou G). Les facteurs GATA1, 2 et 3 jouent un rôle essentiel dans la différenciation des lignages hématopoïétiques, tandis que les facteurs GATA4, 5 et 6 sont majoritairement exprimés dans le cœur, l'intestin et les gonades (pour revue : Viger *et al.*, 2008). Sous l'effet inducteur de BMP2, GATA2 est exprimé dès E10,5 dans la région ventrale de la poche de Rathke (Dasen *et al.*, 1999). GATA3 y est également exprimé de façon transitoire entre E10,5 et E13,5, contrairement à GATA2 dont l'expression persiste chez l'adulte dans les cellules gonadotropes et thyrotropes (Dasen *et al.*, 1999). L'expression d'un dominant négatif de GATA2 dans les lignages exprimant l' $\alpha$ GSU induit une diminution drastique de l'expression des marqueurs du lignage gonadotrope, *Sf1* et *Lh $\beta$* , ainsi que du lignage thyrotrope, *Tsh $\beta$* , dans l'hypophyse à E18,5, suggérant un rôle crucial de GATA2 dans la différenciation de ces deux lignages. Cependant, l'inactivation ciblée de GATA2 dans l'hypophyse n'abolit pas la différenciation de ces lignages mais entraîne une diminution relativement modérée de la sécrétion de TSH, de LH et de FSH, sans affecter la fertilité des souris mutantes (Charles *et al.*, 2006). Ce résultat, qui tend à minorer l'importance de GATA2 dans la différenciation des lignages hypophysaires ventraux, pourrait être sous-tendu par un effet compensateur de GATA3, dont l'expression est considérablement accrue dans l'hypophyse de ces souris. *In vitro*, ces deux facteurs sont capables de stimuler l'activité du promoteur humain de l' $\alpha$ GSU dans les cellules  $\alpha$ T3-1 (Steger *et al.*, 1994).

Dans le promoteur du *Rgnrh* de rat, l'élément D-LIRE contient un motif TGATAA à son extrémité 3', dont la mutation ciblée induit une forte diminution de l'activité promotrice dans les cellules  $\alpha$ T3-1 (voir V-1.Article 1). Des expériences d'EMSA ont permis d'identifier un complexe liant ce motif, qui est dissocié par compétition avec une sonde non marquée contenant un élément de réponse caractéristique des facteurs GATA (Pincas *et al.*, 2001a). Nous avons alors testé l'hypothèse que les facteurs GATA stimulaient l'activité du promoteur du *Rgnrh* via l'élément D-LIRE. De façon surprenante, dans la lignée non gonadotrope CHO, GATA2 et GATA3 inhibent l'activité de D-LIRE. Après avoir identifié les autres facteurs GATA exprimés dans les cellules gonadotropes  $\alpha$ T3-1, nous avons également testé l'effet des facteurs GATA4 et GATA6, qui induisent respectivement un effet inhibiteur ou très légèrement activateur. En revanche, tous ces facteurs GATA exercent un effet activateur très net sur la séquence D-LIRE Mut1-2-3, mutée sur les trois motifs TAAT. Ces effets sont comparables à ceux induits sur une construction témoin contenant 4 éléments de réponse GATA-RE caractérisés. Ainsi, l'élément D-LIRE semble être la cible de facteurs multiples, incluant des facteurs LIM-HD mais également des facteurs GATA. On peut émettre l'hypothèse que des facteurs se fixant sur les TAAT, probablement de type LIM-HD, interfèrent avec les effets transactivateurs des facteurs GATA. Plus important, une approche par immunoprécipitation de la chromatine a permis d'observer une interaction entre GATA2 et le promoteur du *Rgnrh* *in vivo* dans les cellules L $\beta$ T2, où l'expression de ce facteur, évaluée par immunoblot et immunocytochimie, s'est révélée bien plus élevée que dans la lignée  $\alpha$ T3-1. Dans ces deux lignées, la surexpression de GATA2 (ou GATA3) inhibe l'activité du promoteur du *Rgnrh*. Cette inhibition serait, au moins partiellement, médiée par l'élément D-LIRE. Suite à ces résultats, nous envisageons d'évaluer l'effet de l'anticorps anti-GATA2 sur la formation et/ou la migration des complexes obtenus par EMSA entre l'élément D-LIRE et des extraits nucléaires de cellules gonadotropes, mais également d'évaluer la liaison de GATA2 à D-LIRE par

chromatographie d'affinité sur extraits nucléaires de cellules L $\beta$ T2. Par ailleurs, nous envisageons d'utiliser des siRNA spécifiques de facteurs GATA afin de déterminer quel rôle jouent les facteurs GATA endogènes sur l'activité du promoteur du *Rgnrh* dans le contexte des cellules gonadotropes.

Hors de l'hypophyse, plusieurs facteurs GATA sont présents dès la vie embryonnaire dans les gonades (Viger *et al.*, 2008), qui représentent un site bien caractérisé d'expression extra-hypophysaire du *Rgnrh* (voir § III / 3.1). Dans les lignées ovariennes humaines SVOG-4o et SVOG-4m, un élément activateur liant des facteurs GATA a été caractérisé dans une région distale du promoteur humain du *Rgnrh*, constituant un promoteur alternatif utilisé spécifiquement dans ce contexte cellulaire (Cheng *et al.*, 2002). Associée à nos observations, cette donnée soutient l'hypothèse d'un rôle essentiel des facteurs GATA dans la régulation du *Rgnrh* mammalien, non seulement dans les cellules gonadotropes mais également dans le contexte de sites d'expression extra-hypophysaires tels que les gonades.

#### 1.1.5. SF1

SF1 est depuis longtemps considéré comme un facteur essentiel de la différenciation terminale du lignage gonadotrope. Cependant, les cellules gonadotropes des souris invalidées pour *Sf1* sont capables de produire la LH et la FSH sous traitement par la GnRH, suggérant que ce facteur n'est pas indispensable à la différenciation terminale de ce lignage (Ikeda *et al.*, 1995). D'autres facteurs pourraient agir en compensant la perte de SF1. Parmi les candidats potentiels, EGR1 est un facteur de transcription à doigts de zinc inductible par la GnRH (voir § III / 1.1.2.c) agissant en synergie avec SF1 pour activer le gène de la LH $\beta$  (Tremblay et Drouin, 1999). Ce facteur est exprimé préférentiellement par les cellules gonadotropes, thyroïdotes et somatotropes. En accord avec ces données, les souris *Egr1*<sup>-/-</sup> présentent un nombre réduit de cellules somatotropes et une diminution de l'expression de la LH $\beta$  (Lee SL *et al.*, 1996). Cependant, l'expression normale de la FSH $\beta$  indique que le processus de différenciation terminale des cellules gonadotropes est normal chez ces souris, démontrant que l'action d'EGR1 est restreinte à la régulation de l'expression de la LH $\beta$  *in vivo* et laissant ainsi ouverte la question du mécanisme compensant la perte de SF1.

Une autre question essentielle concerne les mécanismes régulant l'expression de SF1 dans les cellules gonadotropes, en particulier ceux qui induisent son expression dans la poche de Rathke, participant ainsi directement à l'émergence du lignage gonadotrope. Réalisées avec des séquences 5' non traduites relativement courtes du gène *Sf1*, les premières tentatives de transgénèse additionnelle pour définir la région régulatrice capable d'induire l'expression du transgène dans les sites d'expression connus de SF1 ont d'abord été infructueuses. Suite à ces échecs, un modèle portant le gène rapporteur de l'eGFP (enhanced GFP) sous le contrôle d'une région 5' non traduite de 50 kb a été créé (Stallings *et al.*, 2002). Chez ces souris, l'eGFP est exprimée dans de multiples sites d'expression du gène endogène, incluant les gonades, les glandes surrénales et l'hypothalamus ventro-médian. En revanche, le promoteur de 50 kb n'est pas capable d'induire l'expression du transgène dans les cellules gonadotropes. Plusieurs lignées murines ont alors été créées par une



autre équipe, portant un promoteur plus court de 6 kb placé en amont du gène rapporteur *LacZ*, ainsi qu'une séquence en aval du gène rapporteur correspondant à différentes régions du locus SF1 (Shima *et al.*, 2005). Ces modèles ont permis d'identifier un enhancer de 5,8 kb, recouvrant la fin du 6<sup>ème</sup> intron et une partie du 7<sup>ème</sup> et dernier exon de SF1, induisant une expression de *LacZ* dans la poche de Rathke à E14,5. Dans cette région, une séquence intronique de 0,5 kb est suffisante pour diriger l'expression du gène rapporteur, toujours placé en aval du promoteur de 6 kb, dans la poche de Rathke et dans les cellules gonadotropes chez l'adulte (Shima *et al.*, 2008). En outre, cette séquence contient un élément de réponse putatif pour PITX2 dont la mutation abolit l'efficacité de l'enhancer. Une approche par immunoprécipitation de la chromatine a permis de démontrer une interaction entre l'enhancer et PITX2 *in vivo* dans l'hypophyse adulte. Ces résultats, en accord avec la diminution drastique de l'expression de SF1 dans l'hypophyse des souris *Pitx2<sup>neo/neo</sup>* (Suh *et al.*, 2002, voir § V / 1.1.3.a), suggèrent fortement un rôle direct de PITX2 dans la régulation de l'expression hypophysaire de ce facteur. Présent dans l'hypophyse tout au long du développement, PITX2 pourrait notamment participer à l'émergence de l'expression de SF1 vers E14, qui est généralement considérée comme le premier évènement de différenciation terminale du lignage gonadotrope. Ce dernier fait pourrait être remis en question par l'activation encore plus précoce du promoteur du *Rgnrh*, qu'il s'agisse du promoteur de rat de 3,3kb dans le modèle *Rgnrh-hPLAP* créé au laboratoire, activé dès E13,5 (Granger *et al.*, 2004), ou du promoteur endogène de souris dans le modèle *Rosa26-Yfp x Rgnrh-Cre*, qui est activé dès E12,75 (Wen *et al.*, 2010). En l'absence de SF1, l'expression du *Rgnrh* pourrait notamment être induite par ISL1 et LHX3, qui sont coexprimés avec l'activité hPLAP dès E13,5 chez les souris *Rgnrh-HPLAP* (Granger *et al.*, 2006). Par la suite, dès qu'il commence à s'exprimer, SF1 pourrait amplifier de façon importante l'activité du gène, comme le suggèrent les effets synergiques exercés par SF1, ISL1 et LHX3 *in vitro* sur l'expression du *Rgnrh*, et plus particulièrement au niveau des deux éléments LIRE (voir V-1.Article 1 ; Granger *et al.*, 2006).

## **1.2. Caractéristiques des mécanismes régulant l'ontogenèse de la fonction gonadotrope et l'expression du *Rgnrh***

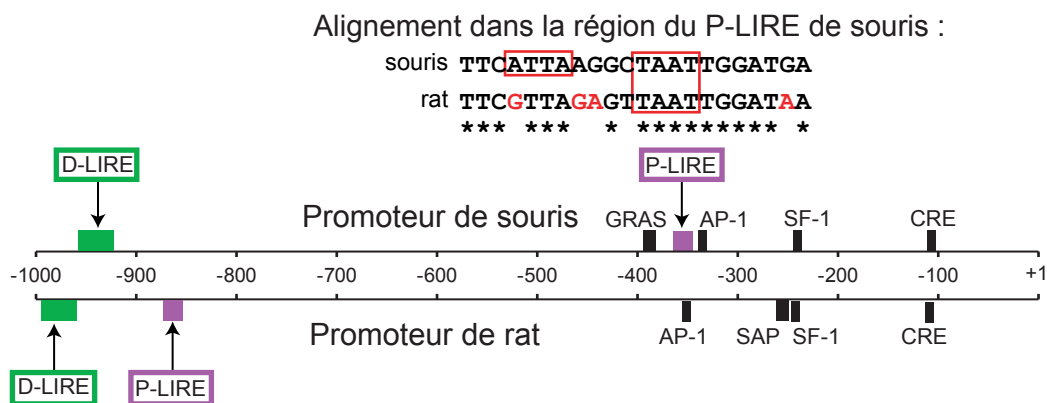
### **1.2.1. Redondance et robustesse**

Les mécanismes impliqués dans le développement hypophysaire permettent d'illustrer de multiples cas de redondance fonctionnelle entre les facteurs intervenant dans ce processus. Cette redondance est bien établie par la caractérisation de doubles mutants pour les couples PITX1/PITX2 et LHX3/LHX4 (Sheng *et al.*, 1997, Charles *et al.*, 2005), alors qu'un mécanisme semblable est fortement suggéré dans le cas de GATA2 et GATA3 ainsi que pour SF1, sans toutefois que les molécules compensant l'absence de ce facteur aient été clairement identifiées (Ikeda *et al.*, 1995, Charles *et al.*, 2006). L'existence de ces redondances reflète probablement des évènements de duplications de génome survenus au cours de l'évolution, voire des duplications isolées de fragments chromosomiques ou de gènes, conduisant à la présence dans un même organisme de plusieurs gènes homologues susceptibles de contribuer conjointement à la mise en place et au fonctionnement

d'une structure donnée. Les redondances permettent ainsi à l'organisme d'acquérir non seulement une robustesse vis-à-vis d'une mutation « perte de fonction » affectant l'un des facteurs, mais également une capacité d'évolution accrue. Ceci est notamment mis en évidence lors de la création de lignées « knock-out » présentant un phénotype normal ou faiblement altéré. Ainsi, l'invalidation de PITX1, d'OTX1 ou encore de GATA2 de façon ciblée dans l'hypophyse induisent un effet relativement limité sur la différenciation des lignages hypophysaires (Acampora *et al.*, 1998, Szeto *et al.*, 1999, Charles *et al.*, 2006). Sur le promoteur du *Rgnrh*, nous avons notamment pu observer un effet redondant d'OTX1 et OTX2, qui stimulent l'activité promotrice de façon équivalente en association avec PROP1 (voir V-3.Article 3). En revanche, aucun effet additif n'est observé en associant PROP1 à la fois avec OTX1 et OTX2, suggérant que ces deux facteurs agissent par un mécanisme identique (non illustré). En parallèle, certains éléments de réponse cis-régulateurs peuvent être présents en plusieurs copies dans le promoteur du *Rgnrh*. En particulier, le promoteur murin possède un élément de réponse aux protéines LIM-HD homologue à l'élément P-LIRE (-973/-852) du promoteur rat, qui est positionné en antisens dans la région proximale du promoteur murin (-363/-342) (**Figure 16**). Chez le rat, la séquence proximale correspondante n'est pas active dans les lignées gonadotropes, et présente une différence de séquence dans le motif ATTA en 5'. De même, la séquence murine distale s'alignant avec le P-LIRE de rat ne possède pas de motifs ATTA et TAAT conservés. Ces deux promoteurs auraient ainsi gardé un seul élément P-LIRE fonctionnel, partageant une forte homologie de séquence (17 pb communes sur 22, soit 77% d'homologie, dont 14 pb centrales identiques) mais localisés dans deux régions distinctes et en sens inverse. En outre, l'élément D-LIRE caractérisé chez le rat, hautement conservé chez la souris (91% d'homologie), pourrait jouer un rôle partiellement redondant avec l'élément P-LIRE vis-à-vis de la réponse aux protéines LIM-HD. Ces observations renforcent l'hypothèse d'un rôle crucial des facteurs LIM-HD dans l'expression du *Rgnrh* et très probablement dans la différenciation terminale du lignage gonadotrope.

### 1.2.2. Combinatoire transcriptionnelle : exemple du code LIM

La régulation de l'activité promotrice du *Rgnrh* dans les cellules gonadotropes met en jeu un ensemble de facteurs de transcription qui agissent de façon dépendante les uns des autres au sein d'une combinatoire transcriptionnelle. Cette combinatoire, qui inclut l'ensemble de éléments cis- et facteurs trans-régulateurs participant à la régulation du promoteur, peut varier au cours du développement mais également en fonction du site d'expression du *Rgnrh*, comme nous le verrons par la suite. En théorie, de multiples combinaisons sont réalisables à partir d'un nombre limité d'acteurs moléculaires. Cet aspect est particulièrement bien illustré dans le cas de la spécification des neurones de la moelle épinière par les protéines LIM-HD. Dans ce site, les facteurs LIM-HD constituent un « code LIM », engageant la cellule indéterminée dans une voie de différenciation définie. Ainsi, l'expression de LHX3 seul induit la différenciation des interneurons V2, alors que l'expression conjointe de LHX3 et ISL1 détermine la différenciation d'une population de motoneurons, selon un mécanisme mettant en jeu un troisième acteur moléculaire, le facteur NLI (nuclear LIM interactor / LDB1 / CLIM2) (Thaler *et al.*, 2002). Dans les interneurons V2, un dimère



Alignement dans la région du P-LIRE de rat :

```

souris GATTCTAAGTAGCCTCAATGTG
rat    GATTCTAATTAGCCTTAATGCA
      *****  *****  *****

```

Souris P-LIRE (-)	□	-342	TCATCCAATTAGCCTTAATGAA	-363
Rat P-LIRE (+)	□	-873	GATTCTAATTAGCCTTAATGCA	-852
			** ***** *	

Souris D-LIRE (+)	□	-961	TGTGATGAAAGCAAAGTAATTGGTAATCTGATAAC	-927
Rat D-LIRE (+)	□	-994	TATAATGGAAGCAAAGTAATTGGTAATCTGATAAC	-960
	□		* * * * *	

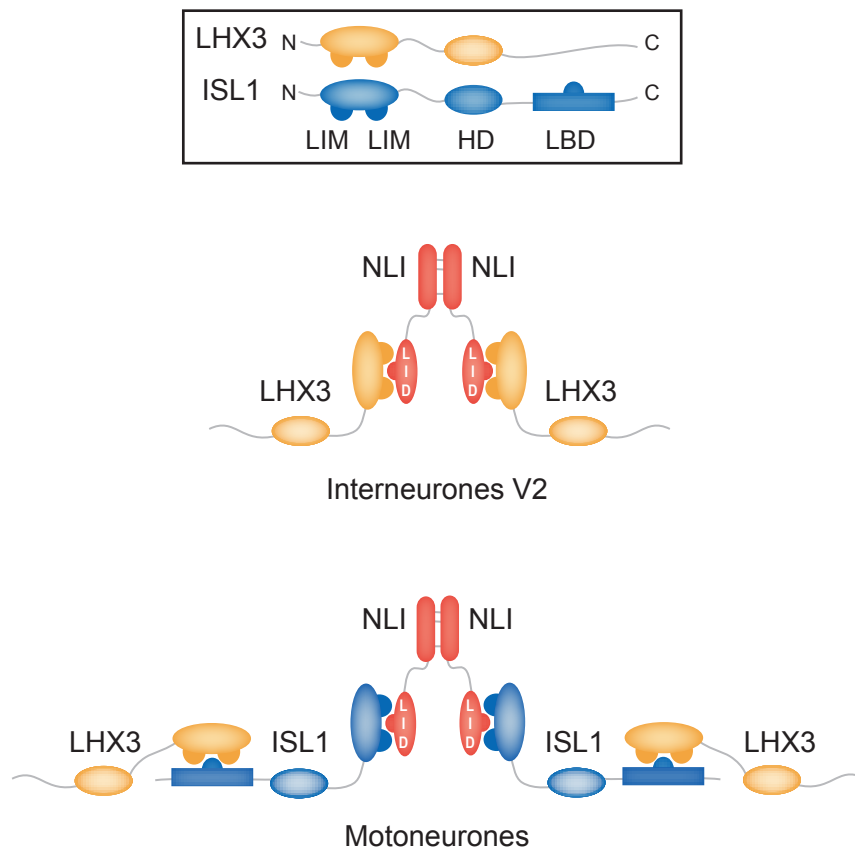
**Figure 16 :**  
**Comparaison des éléments de réponse aux facteurs LIM à homéodomaine sur les promoteurs de rat et de souris**

Les comparaisons de séquences ont été réalisées à partir du programme ClustalW2 fourni par le European Bioinformatics Institute à l'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). L'élément P-LIRE caractérisé dans l'enhancer distal du promoteur de rat n'est pas conservé chez la souris. Dans cette espèce, un élément de réponse homologue est présent dans la région proximale du promoteur, en sens inverse (encadré violet). En revanche, l'élément D-LIRE est conservé entre les deux espèces dans la même région du promoteur (encadré vert). Au final, chaque promoteur comporte deux éléments LIRE caractérisés qui présentent les mêmes potentialités de régulation par les protéines LIM-HD.

NLI s'associe à deux molécules de LHX3 pour former un complexe tétramérique (**Figure 17**). Dans les motoneurones, ISL1 déplace la liaison entre NLI et LHX3, s'intercalant entre ces deux molécules au sein d'un complexe hexamérique. Le domaine d'ISL1 impliqué dans l'interaction avec les domaines LIM de LHX3, nommé LBD (pour LHX3 Binding Domain), a été délimité récemment (Bhati *et al.*, 2008). La comparaison des interactions ISL1/LHX3 et NLI/LHX3 a permis de démontrer que le domaine LBD d'ISL1 et le domaine LID (LIM Interaction Domain) de NLI interagissent avec LHX3 de façon comparable, bien que ces deux domaines ne partagent pas d'homologie de séquence. Ces exemples permettent de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'interaction d'un même facteur, ici LHX3, avec plusieurs partenaires différents en fonction du type cellulaire, induisant la formation de combinaisons spécifiques et l'engagement de la cellule dans une voie de différenciation donnée.

Dans l'hypophyse, une étude réalisée chez le porc a permis de démontrer une interaction entre NLI et le facteur LIM-HD LHX2 dans l'hypophyse par une approche de double hybride (Susa *et al.*, 2006). Transfecté dans la lignée LβT2, NLI joue un rôle de corépresseur en association avec LHX2 sur l'activité du promoteur de l' $\alpha$ GSU porcine. Au laboratoire, la surexpression de NLI par transfection transitoire dans les lignées gonadotropes murines a été réalisée en présence d'ISL1 et LHX3, sans modifier de façon significative l'effet de l'hétérodimère sur l'activité du promoteur du *Rgnrh* de rat. Cependant, ce résultat n'exclut pas la possibilité d'une implication du facteur NLI endogène dans l'action des protéines LIM-HD. Ces facteurs semblent particulièrement bien adaptés pour agir au sein d'une combinaison transcriptionnelle. En effet, leur domaine LIM constitue un module capable de participer à de nombreuses interactions protéines-protéines (Dawid *et al.*, 1998). A titre d'illustration, LHX3 interagit non seulement avec ISL1 mais également avec PITX1 et PIT1 pour réguler l'activité de gènes marqueurs de lignages hypophysaires (voir § III / 2.4.4.a ; Bach *et al.*, 1997, Sloop *et al.*, 2001, Granger *et al.*, 2006). En outre, le facteur CLIM1, apparenté à NLI (CLIM2), est impliqué dans l'interaction entre LHX3 et PITX1 régulant l'activité du promoteur de  $\alpha$ GSU murine (Bach *et al.*, 1997). Par ailleurs, au laboratoire, une interaction fonctionnelle synergique a été observée entre les facteurs LIM-HD et SF1, de manière reproductible, sous-tendue par une interaction physique observée dans des expériences de co-immunoprécipitation (Granger *et al.*, 2006).

Ainsi, la régulation du promoteur du *Rgnrh* de rat dans les cellules gonadotropes semble mettre en jeu de nombreuses interactions entre les éléments cis- et facteurs trans-régulateurs qui définissent une combinaison transcriptionnelle dépendant du stade de développement considéré. Nos résultats suggèrent notamment un dialogue subtil entre les facteurs LIM-HD et les facteurs GATA au niveau de l'élément D-LIRE, dont les modalités et les implications restent à élucider. Ces facteurs, exprimés très précocement au cours de l'ontogenèse hypophysaire, pourraient contribuer à l'émergence de l'expression du *Rgnrh*, mais pourraient également participer au maintien et/ou à la régulation de son expression chez l'adulte. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires en jeu pourraient être différents dans les sites d'expression extra-hypophysaires du *Rgnrh*. L'expression du transgène hors de l'hypophyse chez les souris *Rgnrh-hPLAP* nous a incités à examiner en détail plusieurs sites extra-hypophysaires d'activité du promoteur. Parmi eux, l'hippocampe constitue un site



**Figure 17 :**  
**Le code LIM dans la moelle épinière**

Dans les motoneurones, ISL1 et LHX3 sont associés au sein d'un hétéramère, qui met en jeu un dimère de NLI (Nuclear LIM Interactor). Dans les interneurones V2, LHX3 seul forme un tétramère avec NLI. Schéma modifié d'après Thaler *et al.*, 2002.  
LBD : LHX3 Binding Domain ; LID : LIM Interaction Domain.

d'expression bien caractérisé du *Rgnrh*, contrairement à la rétine et à la glande pinéale chez les Mammifères. Ces études sont également l'occasion de faire le bilan des avantages et des limites liées à l'étude d'un tel modèle transgénique.

## 2. Sites extra-hypophysaires d'expression du *Rgnrh*

### 2.1. Expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe

#### 2.1.1. Caractéristiques spatio-temporelles de l'expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe

Alors que l'expression du *Rgnrh* est bien établie dans l'hippocampe chez l'adulte (voir § III / 3.3.2), nos travaux constituent la première description de l'expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe au cours du développement (voir V-2.Article 2). La quantification relative des niveaux d'ARNm du *Rgnrh* a clairement démontré que cette expression hippocampique apparaît uniquement après la naissance, contrastant avec l'hypophyse où ce gène est exprimé dès le développement embryonnaire (Granger *et al.*, 2004). Cette cinétique d'expression postnatale a pu être confirmée en évaluant l'activité du promoteur de 3,3 kb du *Rgnrh* de rat dans l'hippocampe des souris *Rgnrh-hPLAP*. Nos données sont cohérentes avec la mise en évidence récente de l'expression du récepteur par immunohistochimie dans les cerveaux murin et ovin ainsi que dans le cerveau humain, en particulier dans la formation hippocampique (Albertson *et al.*, 2008a, Wilson *et al.*, 2006). La présence du *Rgnrh* dans l'hippocampe chez l'humain, l'ovin, la souris et le rat conforte l'hypothèse d'un rôle essentiel du système GnRH dans cette structure.

Dans l'hypophyse des souris *Rgnrh-hPLAP*, le transgène est spécifiquement exprimé par les cellules gonadotropes, à l'image du récepteur naturel (Granger *et al.*, 2004). La détection de l'activité hPLAP s'est révélée hautement résolutive, très sensible et aisée à mettre en œuvre. Ces caractéristiques nous ont permis d'analyser en profondeur la localisation de l'activité hPLAP dans l'hippocampe. Ainsi, le transgène est exprimé dans une population restreinte de neurones hippocampiques postmitotiques, comme nous avons pu l'observer à la fois *in vivo* sur coupes de cerveau adulte et *in vitro* dans des cultures primaires d'hippocampe. En revanche, le marqueur astrocytaire GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) n'est jamais colocalisé avec le transgène, démontrant que ce dernier n'est pas exprimé dans les cellules gliales. L'activité hPLAP intense observée dans le *stratum oriens* et le *stratum radiatum* est cohérente avec les données antérieures obtenues par liaison de <sup>125</sup>I-GnRH et détection autoradiographique du récepteur (Leblanc *et al.*, 1988, Ban *et al.*, 1990). En revanche, les travaux menés par hybridation *in situ* ont révélé l'expression du transcrit dans la couche pyramidale contenant les corps cellulaires des neurones hippocampiques (Jennes et Woolums, 1994, Jennes *et al.*, 1997). L'ensemble de ces données suggère que le *Rgnrh*

est synthétisé dans la couche pyramidale puis migre le long des fibres des *strata oriens* et *radiatum*. L'activité hPLAP reproduit plutôt la distribution du récepteur fonctionnel que celle de son transcrit. L'enzyme hPLAP semble migrer conjointement avec le récepteur, probablement du fait de l'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) de cette protéine à la membrane plasmique (Badaloni *et al.*, 2007). D'autres données obtenues avec un anticorps anti-RGnRH privilégient un marquage de la couche pyramidale, en contradiction avec les données obtenues par liaison de <sup>125</sup>I-RGnRH (Wilson *et al.*, 2006, Albertson *et al.*, 2008a). Toutefois, compte tenu de la fiabilité limitée des anticorps anti-RGnRH, nous concluons plutôt sur la base des données de liaison et d'hybridation *in situ*.

Notre modèle transgénique a en outre permis d'observer un marquage intense dans le septum latéral, apparaissant de façon simultanée avec le marquage hippocampique au cours du développement postnatal. De plus, nous avons observé des fibres marquées dans la *fimbria* tout le long du trajet entre ces deux structures. D'après ces observations, l'expression du transgène dans le septum latéral est probablement consécutive au transport de l'enzyme hPLAP le long des fibres nerveuses s'étendant depuis l'hippocampe en direction de la région septale. Ce transport hippocampo-septal concernerait le RGnRH lui-même, puisque le récepteur est effectivement détecté dans cette région avec un ligand marqué alors qu'aucun signal n'est observé par hybridation *in situ* (Jennes et Woolums, 1994). Cette protéine est donc présente mais synthétisée ailleurs, et, selon toute vraisemblance, dans l'hippocampe. L'existence établie des projections hippocampo-septales fournit un support neuroanatomique logique à un tel mécanisme (Alonso et Köhler, 1982, Linke *et al.*, 1995, Gao *et al.*, 1996, Yue *et al.*, 2002).

### **2.1.2. Régulation hippocampique de l'expression du *Rgnrh***

L'analyse de l'expression de facteurs de transcription couplée aux transfections transitoires dans des cultures primaires d'hippocampe de rat nous a permis d'initier le décryptage des mécanismes modulant l'activité du promoteur du *Rgnrh*. Nous avons ainsi établi que la combinatoire transcriptionnelle en jeu dans l'hippocampe est clairement différente de celle identifiée dans l'hypophyse. De toute évidence, les données acquises à la fois *in vivo* et *in vitro* démontrent que le code hippocampique ne comprend ni les facteurs LIM-HD ISL1 et LHX3 ni SF1, facteurs qui jouent ensemble ou séparément un rôle crucial dans l'expression hypophysaire du *Rgnrh* chez le rat, l'homme et la souris (Hapgood *et al.*, 2005, Granger *et al.*, 2006). D'après nos résultats, cette combinaison spécifique de facteurs implique CREB, NUR77, FOS et très vraisemblablement d'autres facteurs non encore identifiés. L'un d'entre eux pourrait interagir avec la partie très proximale du promoteur (-56/-32), comme le suggère l'activité cis-régulatrice élevée de cette région dans les cellules hippocampiques.

Par ailleurs, notre étude suggère l'existence de mécanismes répresseurs avant l'émergence de l'expression du *Rgnrh* au cours du développement postnatal. Lors de la différenciation neuronale, la levée de répression transcriptionnelle semble en effet constituer un mécanisme général, où le facteur répresseur REST/NRSF (Repressor Element-1 Silencing Transcription / Neuron-Restrictive

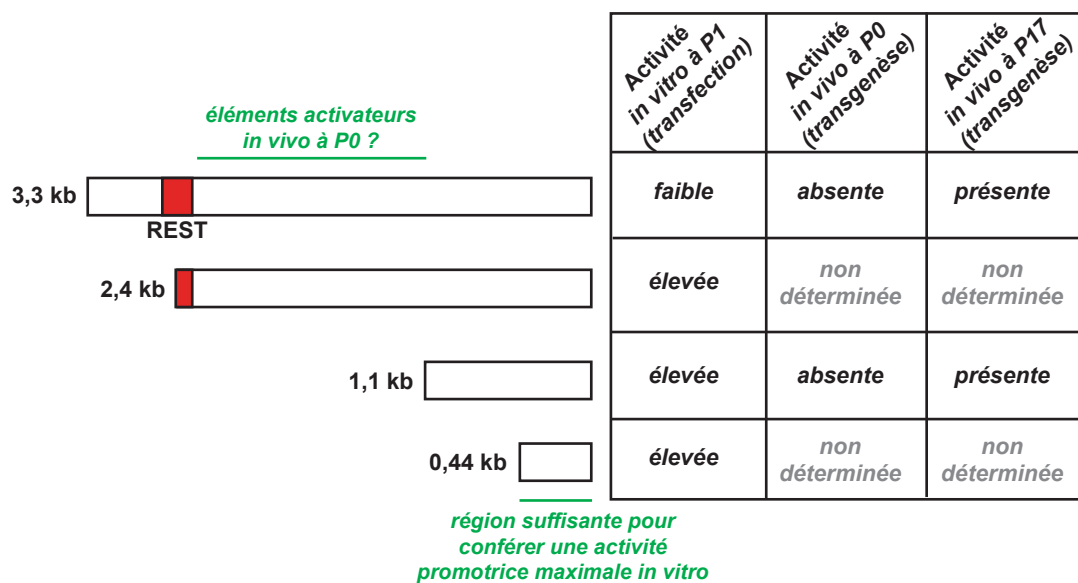
Silencer Factor) joue un rôle crucial (pour revue : Hirabayashi et Gotoh, 2010). Le promoteur du *Rgnrh* de rat contient un motif apparenté à l'élément REST en position -2404/-2385. Il présente une homologie élevée avec la séquence consensus REST, laissant supposer un rôle de ce facteur dans la répression de l'expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe pendant la vie embryonnaire et autour de la naissance. Des expériences de transfection dans des cultures primaires d'hippocampe d'âge équivalent à P (jour postnatal) 1 ont démontré que la délétion de la région distale interrompant l'élément REST conduit à une augmentation de l'activité du promoteur (-2392/-32) par rapport à l'activité du promoteur intact (-3255/-32). Ce même promoteur a été utilisé pour diriger l'expression du transgène *in vivo*. Par conséquent, la cinétique d'expression du transgène observée chez les souris *Rgnrh-hPLAP* pourrait résulter d'une répression induite par REST avant et autour de la naissance, suivie d'une levée progressive de la répression dans la période postnatale. Cependant, ces résultats ne démontrent pas formellement l'implication de REST, et l'inhibition du promoteur long *in vitro* pourrait être médiée par un (ou plusieurs) autre(s) élément(s) localisé(s) dans la région distale délétée (-3255/-2393). Afin d'évaluer l'importance potentielle de l'élément REST *in vivo*, nous avons récemment analysé la cinétique d'expression du transgène dans une lignée murine exprimant l'*hPLAP* sous le contrôle d'un promoteur plus court de 1,1 kb, ne comportant donc pas cet élément. Chez ces souris, l'expression du transgène dans l'hippocampe à P0 n'est pas détectable malgré l'absence de l'élément REST. Cette observation suggère que le mécanisme répresseur observé *in vitro* n'est pas en jeu *in vivo*. Il est aussi possible que la délétion de 2 kb supprime non seulement un élément répresseur mais également un (ou plusieurs) élément(s) activateur(s) probablement localisé(s) entre -2,4 et -1,1 kb. Une troisième hypothèse impliquerait deux conditions nécessaires à l'activation du *Rgnrh* : la levée de répression conjuguée à l'expression de facteurs activateurs. Les observations principales réalisées *in vitro* et *in vivo* concernant cet aspect de la régulation du promoteur dans l'hippocampe sont résumées sur la **Figure 18**.

Dans le modèle portant le promoteur court de 1,1 kb, le transgène est exprimé dans l'hippocampe adulte. Il pourrait être intéressant d'analyser en parallèle les cinétiques d'expression des transgènes dirigés par le promoteur long et le promoteur court. Les premières observations réalisées dans ce but ne permettent pas d'établir de différence entre les deux modèles, suggérant que toute la région en amont des 1,1 kb proximaux ne joue qu'un rôle mineur dans la régulation du promoteur *in vivo*. Cette région pourrait néanmoins avoir un impact quantitatif sur la transcription, qu'il serait théoriquement possible d'évaluer en mesurant l'activité hPLAP par colorimétrie sur des extraits de tissu ou en dosant les ARNm du gène rapporteur par RT-PCR quantitative. Cependant, l'absence d'information concernant l'influence du site d'insertion et le nombre de copies insérées rend peu pertinente la comparaison des niveaux d'expression d'un transgène entre différentes lignées.

### 2.1.3. Rôles potentiels du système GnRH dans l'hippocampe

Le rôle du RGnRH dans le système limbique reste largement inconnu. Il pourrait y jouer un rôle associé à la fonction de reproduction, en particulier dans l'amygdale, dont l'implication dans les comportements reproducteurs a été mise en évidence par le passé (Rajendren et Moss, 1993). Le





**Figure 18 :**  
**Bilan des activités promotrices du *Rgnrh* observées dans l'hippocampe *in vivo* et *in vitro***

L'activité des différentes constructions représentées a été évaluée *in vitro* par transfection transitoire dans les cultures primaires d'hippocampes de rats prélevés à E18, équivalent à P1 après cinq jours de culture (voir article 2, figure 5 / Materials and Methods). Les constructions de 3,3 kb et 1,1 kb ont, en outre, été évaluées *in vivo* par l'observation de l'activité hPLAP dans deux lignées transgéniques comportant soit le promoteur de 3,3 kb (lignée *Rgnrh-hPLAP*) soit le promoteur de 1,1 kb fusionné au gène rapporteur *hPLAP* et intégré dans le génome murin.

récepteur pourrait également exercer bien d'autres fonctions, en particulier au cours du développement postnatal. Nos résultats ont démontré que la GnRH, en activant son récepteur dans des cultures primaires d'hippocampe, stimule l'expression des gènes marqueurs de plasticité neuronale comme *Egr1*, la spinophiline et la synaptophysine. De plus, l'expression de ces marqueurs est corrélée à celle du *Rgnrh* *in vivo* dans l'hippocampe en développement. Ces données sont cohérentes avec des travaux antérieurs démontrant le recrutement de la voie PKC et des modifications des propriétés électriques de neurones hippocampiques par la GnRH (voir § III / 3.3.2 ; pour revue : Skinner *et al.*, 2009). La modulation de ces effets après castration illustre la contribution essentielle des stéroïdes dans les fonctions hippocampiques du RGnRH. D'après une étude récente, l'activation du RGnRH induit une augmentation de la densité d'épines synaptiques et de l'expression de la spinophiline dans les neurones hippocampiques *in vitro* (Prange-Kiel *et al.*, 2008). Les effets de la GnRH sont abolis par un inhibiteur de l'aromatase, démontrant qu'ils sont dépendants de la synthèse d'œstradiol produit localement par les neurones. Associés à ces données, nos résultats suggèrent que le système GnRH contribuerait au développement postnatal en régulant la plasticité synaptique. Ces effets que nous avons observés *in vitro* pourraient être médiés par la synthèse d'œstrogènes ou dépendre d'un mécanisme alternatif induit par la signalisation post-RGnRH. Le traitement simultané des cultures d'hippocampe par la GnRH et par un inhibiteur de la synthèse d'œstradiol pourrait contribuer à élucider cette question.

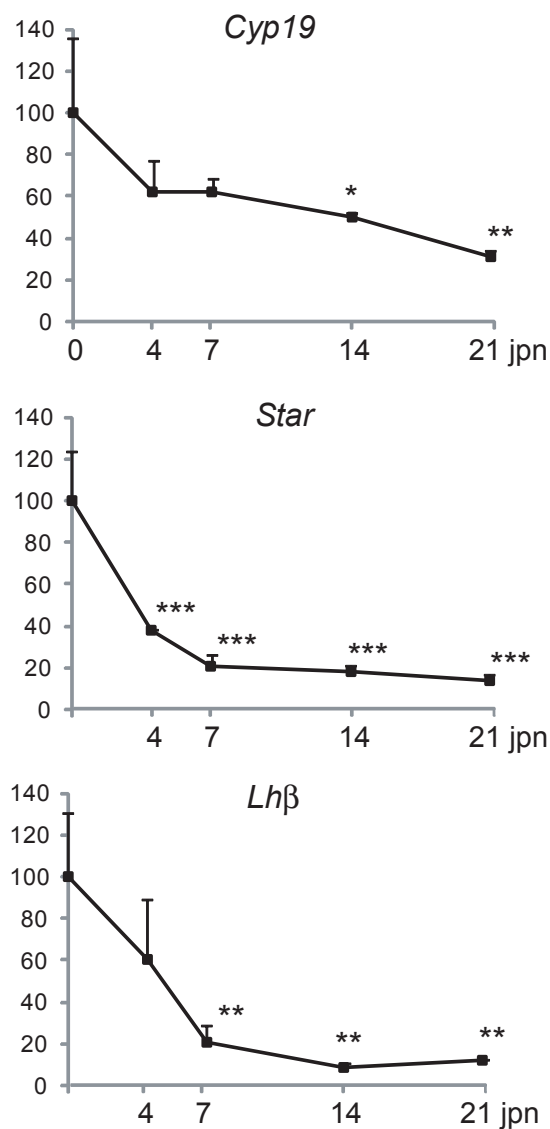
Par ailleurs, un effet positif des œstrogènes a été mis en évidence récemment sur la croissance axonale des neurones hippocampiques (von Schassen *et al.*, 2006). Dans les cellules  $\alpha$ T3-1, la GnRH est capable d'induire des mouvements cellulaires dépendants de l'intégrité du réseau d'actine (Navratil *et al.*, 2007). Sur des tranches d'hypophyse, l'activation du récepteur provoque la formation d'extensions et de mouvements cellulaires, suggérant un rôle de la GnRH sur la plasticité des cellules gonadotropes *in vivo* (Navratil *et al.*, 2007). Plus important, dans la lignée humaine FNC-B4, considérée comme un modèle de neurones à GnRH immatures, la GnRH induit *in vitro* la croissance axonale, la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration neuronale (Romanelli *et al.*, 2004). Compte tenu de l'ensemble de ces résultats et de l'expression probable du transgène *Rgnrh-hPLAP* le long de projections hippocampo-septales, la GnRH pourrait jouer un rôle dans la croissance des neurones hippocampiques au cours de l'établissement des projections vers le septum latéral. A l'image des projections rétino-thalamiques dont l'organisation topographique permet une conservation des propriétés spatiales du signal visuel, les projections hippocampo-septales s'établissent selon une carte topographique définie. En outre, il est bien établi que la mise en place de ces projections met en jeu une famille de ligands transmembranaires, les éphrines, exprimées par le cône de croissance axonal, ainsi que leurs récepteurs à activité tyrosine-kinase présents dans le septum latéral (Gao *et al.*, 1996, Yue *et al.*, 2002 ; pour revue : Martínez et Soriano, 2005). L'expression de ces molécules sous forme de gradients permet aux axones d'atteindre correctement leur cible définitive. La GnRH, qui est fortement exprimée dans la région septale, pourrait constituer un signal diffusible jouant un rôle chémoattractant dans la guidance et/ou la croissance des axones hippocampiques exprimant le *Rgnrh*. Cette hypothèse ouvrirait des perspectives nouvelles quant à la fonction du système GnRH au cours du développement postnatal.

La GnRH est capable d'induire la synthèse d'œstradiol *in vitro* dans des cultures d'hippocampe (Prange-Kiel *et al.*, 2008). Pour cette raison, nous avons entrepris d'évaluer l'effet de la GnRH sur l'expression des gènes codant pour deux facteurs jouant un rôle crucial dans la synthèse de l'œstradiol, l'aromatase (CYP19) et la StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein). Dans les cultures primaires d'hippocampe de rat, le gène *Cyp19*, est exprimé trop faiblement pour être quantifié. La régulation de ce gène par la GnRH est cependant suggérée par une étude récente ayant mis en évidence un effet positif de la GnRH sur la transcription de *Cyp19 in vitro* dans des cellules de granulosa humaines (Winkler *et al.*, 2010). D'autre part, nous sommes parvenus à quantifier le niveau d'expression du gène *Star* dans les cultures d'hippocampe, sans pour autant mettre en évidence d'effet régulateur de la GnRH. A l'inverse, un effet stimulateur de la GnRH (1nM, 90 min) a été observé très récemment sur l'expression du gène *Star* dans la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y (Rosati *et al.*, 2011). Dans ces cellules, les auteurs ont démontré que cet effet dépend de l'activation des récepteurs de la LH. La stimulation de la synthèse de LH par la GnRH est en outre suggérée par une augmentation de la quantité de transcrits du gène *Lhβ* suite à un traitement des cellules par le neuropeptide. Un effet similaire de la GnRH sur l'expression de la protéine LHβ a par ailleurs été observé dans la lignée de neuroblastome humain M17 (Wilson *et al.*, 2006). En résumé, dans la lignée SH-SY5Y, un traitement par la GnRH serait capable d'induire la synthèse de LH, qui, à son tour, induirait l'expression du gène *Star*. La StAR participerait alors à la production d'œstradiol, observée après un traitement des cellules par la GnRH pendant 24 à 72 heures. Si la régulation des gènes *Cyp19* et *Star* par la GnRH était avérée dans l'hippocampe, ces mécanismes pourraient participer à la stimulation de la synthèse d'œstradiol par le neuropeptide observée *in vitro* dans des cultures d'hippocampe (Prange-Kiel *et al.*, 2008). La modulation directe de l'activité de ces enzymes par la signalisation post-récepteur constitue une seconde hypothèse non exclusive n'impliquant pas de régulation transcriptionnelle.

Par ailleurs, la LH constitue une cible essentielle de la signalisation post-RGnRH dans les cellules gonadotropes (voir § III / 1.1.2.c). Comme mentionné ci-dessus, l'expression de la LHβ est modulée *in vitro* par la GnRH dans deux lignées de neuroblastome humain (Wilson *et al.*, 2006, Rosati *et al.*, 2011). En outre, l'expression de la LH a été mise en évidence dans des neurones hippocampiques humains ainsi que dans l'hippocampe de rat âgé (Bowen *et al.*, 2002, Wilson *et al.*, 2006, « discussion »). Dans ce contexte, nous avons recherché un effet de la GnRH sur l'expression du gène *Lhβ* dans les cultures primaires de cellules hippocampiques de rat. Si nos résultats ont confirmé la présence du transcrit de ce gène dans ces cultures, ils n'ont en revanche pas permis de mettre en évidence une régulation de cette expression par la GnRH. Nous avons par ailleurs détecté de faibles taux, non quantifiables, de transcrit de la sous unité αGSU, indiquant une production possible de LH fonctionnelle dans l'hippocampe. Pour conclure de façon plus définitive sur ce point, il serait nécessaire non seulement de tester des doses variables d'agoniste, mais également de comparer les effets de stimulations continues et pulsatiles sur les neurones hippocampiques, compte tenu de l'importance primordiale de ce paramètre dans les effets classiquement induits par la GnRH (voir § III / 1.1.2.c). D'autre part, nous avons pu observer *in vivo* une diminution rapide de l'expression des gènes *Star* et *Lhβ* au cours du développement postnatal dans l'hippocampe de rat, ainsi que de

*Cyp19* mais de façon plus modérée (**Figure 19**). L'expression de ces gènes semble ainsi varier de manière opposée à celle du récepteur. Ces résultats préliminaires doivent être réexaminés et approfondis afin d'évaluer le lien existant entre le système GnRH hippocampique et l'expression de facteurs jouant un rôle crucial à différents niveaux de l'axe gonadotrope.

L'hippocampe constitue la région du cerveau la plus gravement affectée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA). Parmi les mécanismes entraînant la dégénérescence progressive des cellules nerveuses, la formation extracellulaire de dépôts de la protéine  $\beta$ -amyloïde, la polymérisation intra-neuronale de neurofibrilles de protéine Tau hyperphosphorylée ou encore l'excès de stress oxydatif sont le plus souvent invoqués. Bien que l'étiologie de la MA reste mal comprise, elle survient très généralement chez des personnes âgées, de façon plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, laissant supposer une contribution des changements hormonaux liés à la ménopause dans le développement de cette pathologie (pour revue : Webber *et al.*, 2007). La ménopause se caractérise notamment par l'arrêt de la sécrétion d'œstradiol par l'ovaire, induisant secondairement une hausse des taux plasmatiques de LH et de FSH. Des études épidémiologiques ont permis d'observer un taux circulant en gonadotropines deux fois plus élevé chez les patients atteints de la MA par rapport aux individus témoins sains d'une même tranche d'âge (Bowen *et al.*, 2000, Short *et al.*, 2001). Associée à cette observation, l'expression élevée du récepteur de la LH dans l'hippocampe suggère l'implication de cette hormone dans le développement de la MA (Lei *et al.*, 1993). En outre, la LH serait capable de franchir la barrière hémato-encéphalique, comme l'indique une étude concernant l'hCG, hormone étroitement apparentée à la LH et qui interagit avec les mêmes récepteurs (Lukacs *et al.*, 1995). *In vitro*, la LH favoriserait la formation de plaques amyloïdes dans des cultures cellulaires de la lignée M17 (Bowen *et al.*, 2004). *In vivo*, l'effet neurotoxique de la LH est fortement suggéré par l'amélioration des symptômes, suite à un traitement par un agoniste de la GnRH, chez des souris transgéniques âgées servant de modèle d'étude pour la MA (Tg 2576) (Casadesus *et al.*, 2006). Ce traitement, abolissant la sécrétion de LH par l'hypophyse antérieure, entraîne une diminution des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe, associée à une amélioration des performances cognitives des animaux. Comme mentionné plus haut, la LH serait également produite directement dans le cerveau. Chez le rat, l'expression de la LH dans l'hippocampe serait indétectable autour de 3 à 5 mois mais augmenterait avec l'âge chez les animaux de 1 et 2 ans (Wilson *et al.*, 2006 « discussion »). Nos résultats au cours du développement postnatal suggèrent en outre une expression élevée de la LH $\beta$  autour de la naissance (**Figure 19**). Ces deux observations suggèrent une LH hippocampique élevée avant et autour de la naissance ainsi que chez l'animal âgé, et plus faible entre ces deux phases, c'est-à-dire pendant la période de vie reproductive active. Chez l'homme, l'expression de la LH $\beta$  est augmentée dans les neurones hippocampiques des individus atteints de la MA (Bowen *et al.*, 2002). De même, la StAR paraît fortement surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la MA, où elle est en outre colocalisée avec le récepteur de la LH (Webber *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de la LH, produite localement et/ou d'origine périphérique, dans le développement de la MA, favorisant notamment le développement de plaques de protéine  $\beta$ -amyloïde, par un mécanisme qui pourrait mettre en jeu une modulation de la neurostéroïdogenèse. Compte tenu du rôle potentiel du système GnRH hippocampique dans la



**Figure 19 :**  
**Expression de *Cyp19*, *Star* et *Lhβ* dans l'hippocampe en développement**

La quantification des ARNm de *Cyp19*, *Star* et *Lhβ* isolés d'hippocampe de rat a été réalisée par RT-PCR en temps réel comme décrit précédemment (Article 2 / Materials and Methods). jpn : jours post-nataux ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

régulation de ces processus, il serait particulièrement intéressant d'évaluer son implication dans le développement de cette maladie et, plus généralement, dans les processus liés au vieillissement (Wang *et al.*, 2010).

#### **2.1.4. Source de GnRH**

L'une des questions sous-jacentes à notre étude concerne la source de ligand capable d'activer le récepteur hippocampique. Il est important de souligner que la GnRH est quasi-indétectable dans la circulation générale, où sa demi-vie est estimée à 2 ou 3 minutes (Fauconnier *et al.*, 1978). Ce peptide ne peut donc agir qu'à faible distance de son site de libération. La GnRH sécrétée par les neurones hypothalamiques hypophysiotropes au niveau de l'éminence médiane pourrait atteindre l'hippocampe *via* le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Skinner *et al.*, 1995). Cependant, des données récentes ont démontré que la GnRH est présente en concentration active dans le LCR uniquement dans le troisième ventricule à proximité immédiate de l'éminence médiane chez la brebis (Caraty et Skinner, 2008). La GnRH pourrait être produite localement et agir de façon autocrine ou paracrine. Nous avons en effet détecté les transcrits de la GnRH en faible quantité dans l'hippocampe (non illustré). En revanche, nous n'avons pas observé de marquage immunohistochimique suggérant soit que le peptide lui-même n'est pas traduit, soit qu'il s'exprime à un niveau trop faible pour être détecté. Nous avons par ailleurs observé des niveaux élevés du transcrit de la GnRH dans le septum du rat (non illustré), associés à une immunoréactivité anti-GnRH localisée exclusivement dans le septum médian, en accord avec des résultats antérieurs démontrant l'existence de neurones à GnRH dans cette région (Skynner *et al.*, 1999b, Spergel *et al.*, 1999). Comme le septum médian émet des projections vers les régions CA1 et CA3 ainsi que vers le gyrus denté (Colom *et al.*, 2005), la GnRH pourrait vraisemblablement atteindre l'hippocampe par un trajet septo-hippocampique (Jennes et Stumpf, 1980).

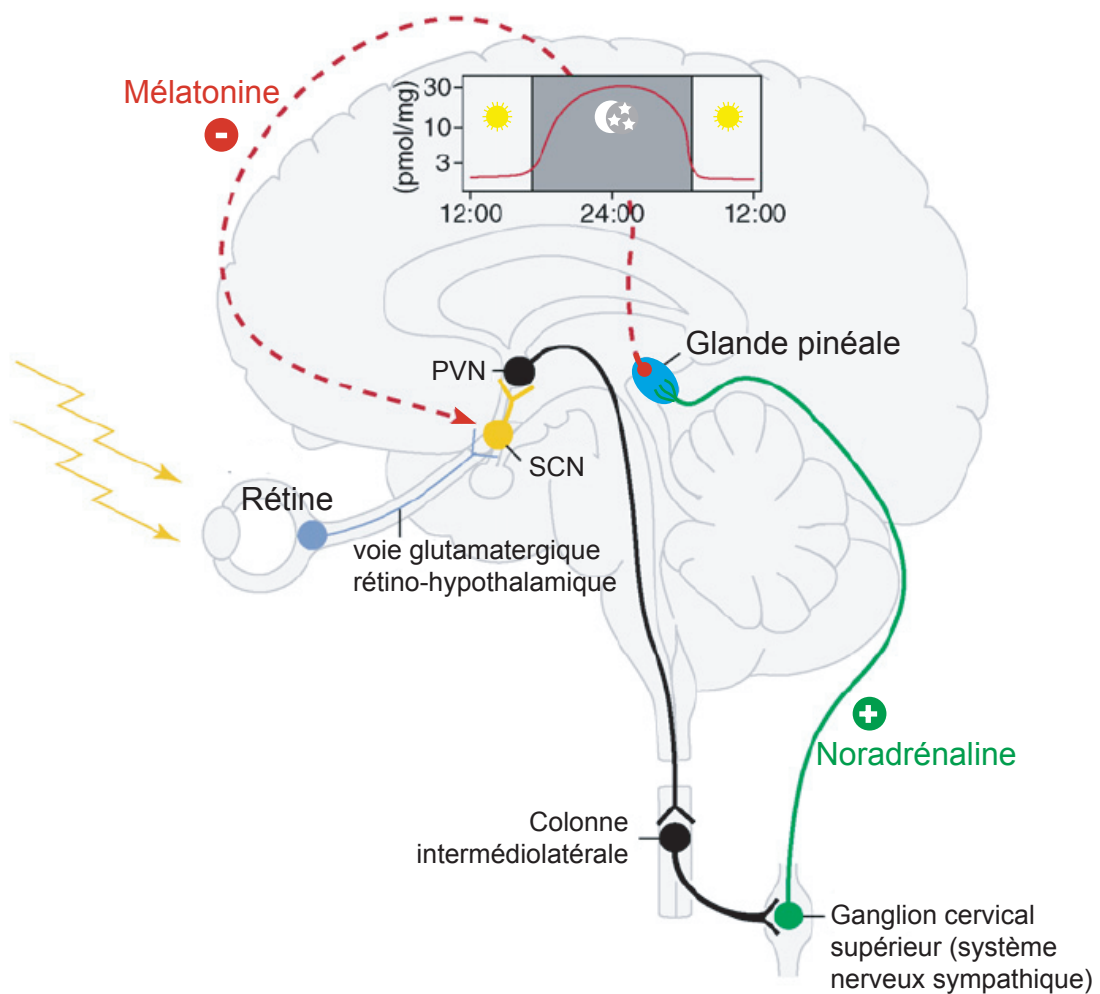
## **2.2. Expression du *Rgnrh* dans la rétine et la glande pinéale**

Pour la première fois chez un mammifère, nous avons démontré que le promoteur du *Rgnrh* pouvait être activé *in vivo* dans deux organes participant conjointement à la synchronisation des rythmes biologiques, la rétine et la glande pinéale (voir V-3.Article 3). Chez les souris *Rgnrh-hPLAP*, l'expression du transgène débute pendant la vie embryonnaire, à E13,5 dans la glande pinéale et à E17,5 dans la rétine. Alors que l'expression rétinienne semble s'atténuer chez l'animal adulte, elle persiste à un niveau apparemment élevé dans la glande pinéale, à l'image de l'expression du transgène dans l'hypophyse. Afin de déterminer quels mécanismes moléculaires pourraient activer le promoteur du *Rgnrh* dans ces sites, nous y avons recherché l'expression des facteurs participant à la combinatoire transcriptionnelle gonadotrope. En outre, la rétine et la glande pinéale sont étroitement apparentées d'un point de vue évolutif et développemental, laissant supposer que certains facteurs présidant à la différenciation de ces deux structures jouent un rôle dans l'activation du promoteur du

*Rgnrh*. La recherche de facteurs de la combinatoire gonadotrope a permis de mettre en évidence une expression des gènes codant les facteurs CREB et NUR77. *A contrario*, SF1 était absent alors que les transcrits codant les protéines LIM-HD ISL1 et LHX3 n'étaient détectés que dans la rétine. Plus important encore, nous avons établi que le facteur Paired-like à homéodomaine OTX2, qui joue un rôle crucial dans la différenciation de la rétine et de la glande pinéale (Nishida *et al.*, 2003), est capable de réguler l'expression du *Rgnrh* à la fois dans le contexte des cellules gonadotropes  $\alpha$ T3-1 (voir § V / 1.1.3.d), mais également dans des cellules non hypophysaires. Dans les cellules hétérologues CHO, OTX2 agit en association avec CREB *via* un nouvel élément de réponse localisé dans la région proximale du promoteur, à 60 pb en amont de l'élément de réponse CRE. La région délimitée, entre -180 et -136, contient un motif TAAT qui pourrait constituer la cible de d'OTX2. Dans les cellules gonadotropes, OTX2 agit préférentiellement en association avec PROP1, facteur qui n'est exprimé ni dans la glande pinéale ni dans la rétine. Ces données suggèrent la mise en jeu de codes transcriptionnels différents entre l'hypophyse et les sites extra-hypophysaires exprimant OTX2 à savoir la glande pinéale et la rétine, qui pourrait impliquer une interaction fonctionnelle différentielle d'OTX2 respectivement avec PROP1 ou CREB.

Comme ce fut le cas dans d'autres sites d'expression du transgène tels que l'hypophyse, l'hippocampe et l'amygdale, nous avons pu établir une corrélation entre l'expression du transgène dans ces deux sites et l'expression du *Rgnrh* endogène. Néanmoins, la nécessité de réaliser 40 cycles ou une PCR emboîtée (Nested PCR) pour le révéler indique que l'expression de ce gène y est probablement plus faible que dans les sites précédemment étudiés. Si nos résultats permettent d'entrevoir un rôle possible de la GnRH au niveau de la glande pinéale, ils posent également la question de l'origine de la GnRH susceptible d'activer le récepteur dans cet organe. En première hypothèse, La GnRH pourrait provenir de fibres nerveuses libérant localement ce neuropeptide, mais également du liquide céphalo-rachidien du 3<sup>ème</sup> ventricule en contact avec la glande pinéale. Une telle présence de GnRH dans le liquide céphalo-rachidien a été clairement mise en évidence chez la brebis et il a été démontré qu'elle avait la même origine que celle du sang porte hypothalamo-hypophysaire (Skinner *et al.*, 1995). Cependant, des données récentes suggèrent que la GnRH du LCR pourrait ne pas atteindre la glande pinéale en concentration active (Caraty et Skinner, 2008). Concernant la rétine, la présence de fibres immunoréactives pour la GnRH a été mise en évidence dans le nerf optique de plusieurs espèces dont le rat (voir § III / 3.4 ; Santacana *et al.*, 1996), chez lequel des projections rétino-pétales à GnRH ont été visualisées par injection d'un traceur rétrograde dans l'œil (Vereczki *et al.*, 2006). En outre, nous avons détecté la présence du transcrit de la GnRH dans la rétine, suggérant une production locale et une action paracrine ou autocrine de ce peptide.

Chez les Mammifères, la glande pinéale assure la production nocturne de mélatonine qui porte le signal neuroendocrine permettant aux autres organes d'adapter leur activité en fonction des alternances jour/nuits et des saisons. Cette glande fait partie d'un ensemble de structures cérébrales et nerveuses interconnectées formant le système photoneuroendocrine dont le moteur est le noyau suprachiasmatique (SCN) hypothalamique (**Figure 20**). Ce dernier constitue l'horloge interne majeure qui module indirectement la sécrétion de mélatonine et, par suite, les rythmes biologiques. Dans ce



**Figure 20 :**  
**Le système photoneuroendocrine**

Chez les Mammifères, la rétine neurosensorielle capte la lumière qu'elle transmet sous forme d'information nerveuse au noyau suprachiasmatique (SCN) via le tractus rétino-hypothalamique, le SCN contrôlant quant à lui l'activité de la glande pinéale *via* le noyau paraventriculaire (PVN) et un circuit nerveux impliquant une colonne de cellules intermédiolatérales de la moelle épinière, des ganglions cervicaux supérieurs et des neurones sympathiques post-ganglionnaires. Pendant la nuit, la glande pinéale synthétise et libère la mélatonine, qui, à son tour, exerce un contrôle sur l'activité du SCN (Schéma modifié d'après Maronde et Stehle, 2007).



système, la rétine intervient en captant la lumière qu'elle transmet sous forme d'information nerveuse au SCN *via* le tractus rétinohypothalamique, le SCN contrôlant quant à lui l'activité de la glande pinéale *via* le noyau paraventriculaire (PVN) et un circuit nerveux complexe impliquant une colonne de cellules intermédiolatérales de la moelle épinière, des ganglions cervicaux supérieurs et des neurones sympathiques post-ganglionnaires (Maronde et Stehle, 2007). De façon intéressante, les gènes de l'horloge *Clock* et *Bmal1* semblent impliqués dans la régulation de l'expression hypophysaire du *Rgnrh* chez la souris (Resuehr *et al.*, 2007). Ces facteurs, qui forment un hétérodimère impliqué dans l'établissement du rythme circadien dans le SCN, sont également exprimés dans plusieurs tissus périphériques incluant la glande pinéale et la rétine, où ils pourraient participer à l'activation du promoteur du *Rgnrh* de rat. Confortant cette hypothèse, la comparaison des régions promotrices proximales (600 pb) de rat et de souris révèle la conservation de cinq motifs E-box chez le rat sur sept présents chez la souris, constituant des sites potentiels de liaison pour ces facteurs de type Hélice-boucle-hélice basique (**Figure 21**).

On sait que l'environnement lumineux joue un rôle déterminant dans les processus biologiques et comportementaux associés à la reproduction. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont été consacrés à l'élucidation des mécanismes de contrôle de la fonction de reproduction par la mélatonine, à savoir en particulier comment la mélatonine peut influencer sur l'activité du système GnRH (Malpoux, 2001). Réciproquement, la question d'une influence de la GnRH sur la production de mélatonine n'a, à ce jour, pas été abordée de façon approfondie (Itoh *et al.*, 2003, Simonneaux et Ribelayga, 2003). La présence possible de RGnRH dans la rétine et dans la glande pinéale constitue dans ce domaine une idée novatrice puisqu'elle suggère une influence potentielle de la GnRH sur le système photoneuroendocrine lui-même. Par ailleurs, la présence et les effets du système GnRH dans la rétine et la glande pinéale ont été étudiés de façon beaucoup plus approfondie chez les poissons Téléostéens (voir § III / 3.4). Ces résultats suggèrent une expression ancestrale du RGnRH dans la rétine et la glande pinéale chez les Gnathostomes, récepteur qui pourrait avoir acquis – ou perdu – certaines fonctions dans chaque groupe de façon indépendante.

### 2.3. Autres sites d'expression du transgène

Outre l'hippocampe et le septum latéral, plusieurs régions du système limbique présentent un marquage hPLAP postnatal, incluant le noyau basal amygdaloïde, marqué de façon intense, ainsi que le cortex enthorinal. Le transgène *Rgnrh-hPLAP* pourrait constituer un outil précieux dans l'étude de l'établissement de projections entre ces différentes structures limbiques. A proximité du système hippocampo-septal, plusieurs autres structures sont marquées chez l'animal après la naissance. Parmi elles, l'organe subfornical ainsi que l'OVLT (Organe Vasculaire de la Lane Terminale) et le MnPO (Median Preoptic Nucleus) hypothalamiques sont trois organes circumventriculaires irrigués par des vaisseaux sanguins dépourvus de barrière hémato-encéphalique. Nos données acquises par immunohistochimie anti-GnRH ont permis d'observer la présence de fibres à GnRH à proximité directe des marquages hPLAP, notamment dans l'OVLT, où la zone exprimant le transgène est entourée par

souris	AAAAATAATTTTACTATAATTTTCAGCATGGATAGTCTGATCATTAAACCAATTGCATAAA	-586
rat	AAAAATAATTTTACTATAATTTTCAGCATGAATAGACTGACAATTAAC--TGATAAA	-628
*****		
souris	CTTAAATCTAGAATAATTTGGTATTAGAACAGGCTGCTTAAACAGTTA---AAGTACTA	-530
rat	CTTGAATCTAGATTAAATTTGTATTAGAACAGTCTGCATAAAATACTAGCTCTATGCACCTG	-568
*** * *****		
souris	GCTATAA-----GTCCGTCGTGTGACTATTTCAGCAAAATGCATT	-491
rat	TCTAAGACAGTTTAAATTAACAAAACGTCCATCGTGTGACTACTCAAGAATACAATT	-508
*** * *****		
souris	TGAAAAGCAATTGTTTGTGAGAAGTATGGTCTTCAACAACAGATTTTAAATTGGATCGGG	-431
rat	TGAAAAGCAATTGTTTGTGAGAAGTATGGTCTTCAACAACAGGTTTCTAATTGGATCAGG	-448
*****		
souris	ATTTTAAATTACTTTTCTGTATTTTCATTTGTATCTGTCTAGTCACAACAGTTTTGTAGA	-371
rat	ATTTTAAATTAGTTTCTGTATTTCTGTTTGCATCTGTCTAGTCACAGCAGGTTTGTAGA	-388
*****		
AP-1		
souris	AAACC-TATTCATTAAGGCTAATTGGATGATATTAAGAGTCACTTTCGACATCAGAATTA	-312
rat	AAACGTATTCGTAGAGTTAATTGGATAATATTAAGAGTCACTTTTAACTTCAGAATTA	-328
*** * *****		
NEUROD/MASH1		
souris	GACTCAAGTGTCTCTTCTCCTACCTACGATAAAAAG-----ACGGGCATCT	-266
rat	GACAGCAAGTGTCTCTTCTCGCCACGATAAAACGCCATGAAAAAAGAACGGTCCATCT	-368
*** *****		
SAP SF1		
souris	GCTGAGGGGTACGGTTACACTTGGCCTTCAAGGAGGCTTGGCATGTTCTGTTAGCACTC	-206
rat	GCTGAGGGGTACGGTTACACTTGGCCTTCAAGGAGGCTTGGCATGTTCTGTTAGCACTC	-208
*****		
souris	TTTGTAGATTATAAACCGAAAAACAAGTTTACCTTGATCTTTCACGTTAAGTCC-AGAGTA	-147
rat	TCTTAGATTATAAATCTCAAAACAAGTTTACCTTGATCTTTCGCATTAAAGTCCCGGAGTA	-148
* *****		
CRE		
souris	TCTTGGGAAAAATAAATTAGGCAGAAATGCTAACCTGTGACGTTTCCATCTAAAGGAGGC	-87
rat	TCTCGGGAAAAATAAATTGACATAAATGTAAGCCTGTGACGTTTCCCTCTAAAGAAGGC	-88
*** * *****		
souris	AGACATCAACAGCGCTTCGCGTTCAAGTTATGATAAAA-CATCAGAAGTAACAGGGACTCC	-28
rat	AGAAAGCAACAGCGCTTCGCGTTCAAGTTACGATAAAAACATCAGCAGTAACAGAGACTCG	-28
*** * *****		
souris	ACTCTGAAGCCTGTCCTTGGAGAAAT -1	
rat	ACTCTGAAGCCCGTCTTGGAGAAAT -1	
*****		

**Figure 21 :**  
**Alignement des régions proximales des promoteurs du**  
***Rgnrh* de souris et de rat**

Les séquences proximales (environ 600 pb) des deux promoteurs ont été comparées en utilisant le programme d'alignement ClustalW2 fourni par le European Bioinformatics Institute (EMBL). Les sept motifs E-box présents dans la séquence de souris sont surlignées en jaune. Sur ces sept motifs, cinq sont parfaitement conservés chez le rat. L'un d'entre eux a été caractérisé chez la souris comme site de liaison pour NEUROD1 dans les cellules  $\alpha$ T3-1 et MASH1 dans les cellules L $\beta$ T2 (Cherrington *et al.*, 2008).

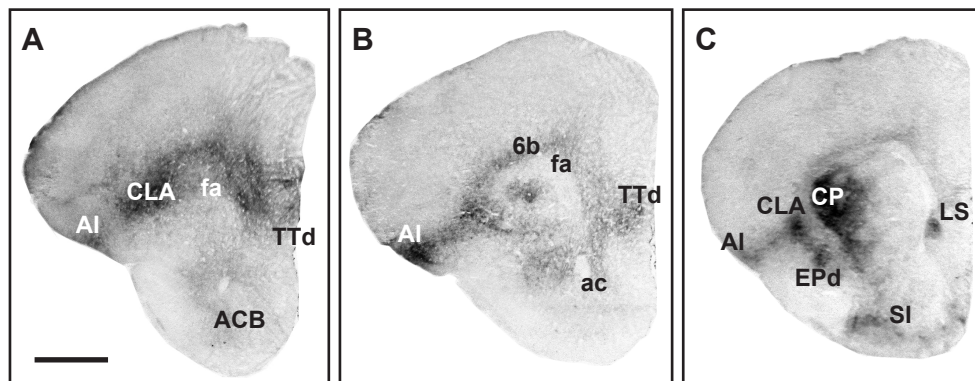
une zone d'expression intense de la GnRH. Cette observation fournit une hypothèse quant à la source de GnRH qui pourrait activer le récepteur dans ces sites. L'absence de colocalisation stricte entre l'expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* et l'anticorps anti-GnRH dans l'hypothalamus est plutôt en faveur d'un mode d'action paracrine de la GnRH. De même, chez les souris *Rosa26-Yfp x Rgnrh-Cre* (voir § III / 2.5.2), le promoteur murin du *Rgnrh* n'induit pas d'expression de l'YFP dans les neurones à GnRH embryonnaires et adultes (Wen *et al.*, 2010). La régulation autocrine des neurones à GnRH, mise en évidence dans une lignée humaine, pourrait être tout à fait spécifique de cette espèce (Romanelli *et al.*, 2004).

Par ailleurs, plusieurs sites d'expression additionnels du transgène ont pu être observés dans le cerveau des souris *Rgnrh-hPLAP*. Ainsi, la région antérieure du cerveau présente plusieurs sites marqués de façon faible et diffuse après la naissance, incluant le claustrum et la partie latérale du caudoputamen (**Figure 22**). Postérieurement, des corps cellulaires marqués ont été observés dans la division latérale du noyau parabrachial ainsi que des fibres dans la partie ventrale de la substance grise périaqueducale (**Figure 23C,E**). Dans le cervelet, un marquage intense est visible dès P0 (**Figure 23B**). A P17, un marquage ponctuel dans la partie centrale du nodulus suggère que des faisceaux de fibres sont orientés selon un axe rostrocaudal (**Figure 23G,I**). En revanche, en position plus dorsale, le marquage homogène des fibres pourrait refléter une orientation temporo-nasale parallèle au plan de coupe (**Figure 23G,H**). Dans le cerveau moyen, le noyau oculomoteur est marqué de façon intense dès le développement embryonnaire (**Figure 23A,C**), de même que les fibres nerveuses qui en sont issues, dont il est possible de suivre la trajectoire jusqu'aux muscles oculomoteurs (voir également V-4.Article 4). De façon analogue, des fibres nerveuses émanant de la *medulla oblongata* s'allongent vers la région postérieure de l'embryon (**Figure 24**). En se rapprochant du plan sagittal, ces fibres sortent du crâne et forment des ganglions au niveau du cou de l'animal, puis un nerf marqué issu d'un renflement ganglionnaire s'étend vers la périphérie. La localisation de ces structures ainsi que leur organisation indiquent qu'il s'agit vraisemblablement du nerf vague (X), qui émerge de la *medulla oblongata*, sort du crâne par le foramen jugulaire en formant successivement deux ganglions (supérieur et inférieur) puis innerve de nombreux organes dans la cavité thoracique et abdominale.

Dans tous ces sites, l'expression du transgène pourrait indiquer une expression du *Rgnrh* lui-même, mais cette corrélation reste néanmoins à établir, de même que le rôle potentiel du récepteur dans ces structures. Si les données acquises grâce à ce modèle transgénique ouvrent des perspectives passionnantes, ses limites doivent néanmoins être prises en considération lors de l'interprétation des données.

## **2.4. Intérêts et limites du modèle transgénique *Rgnrh-hPLAP***

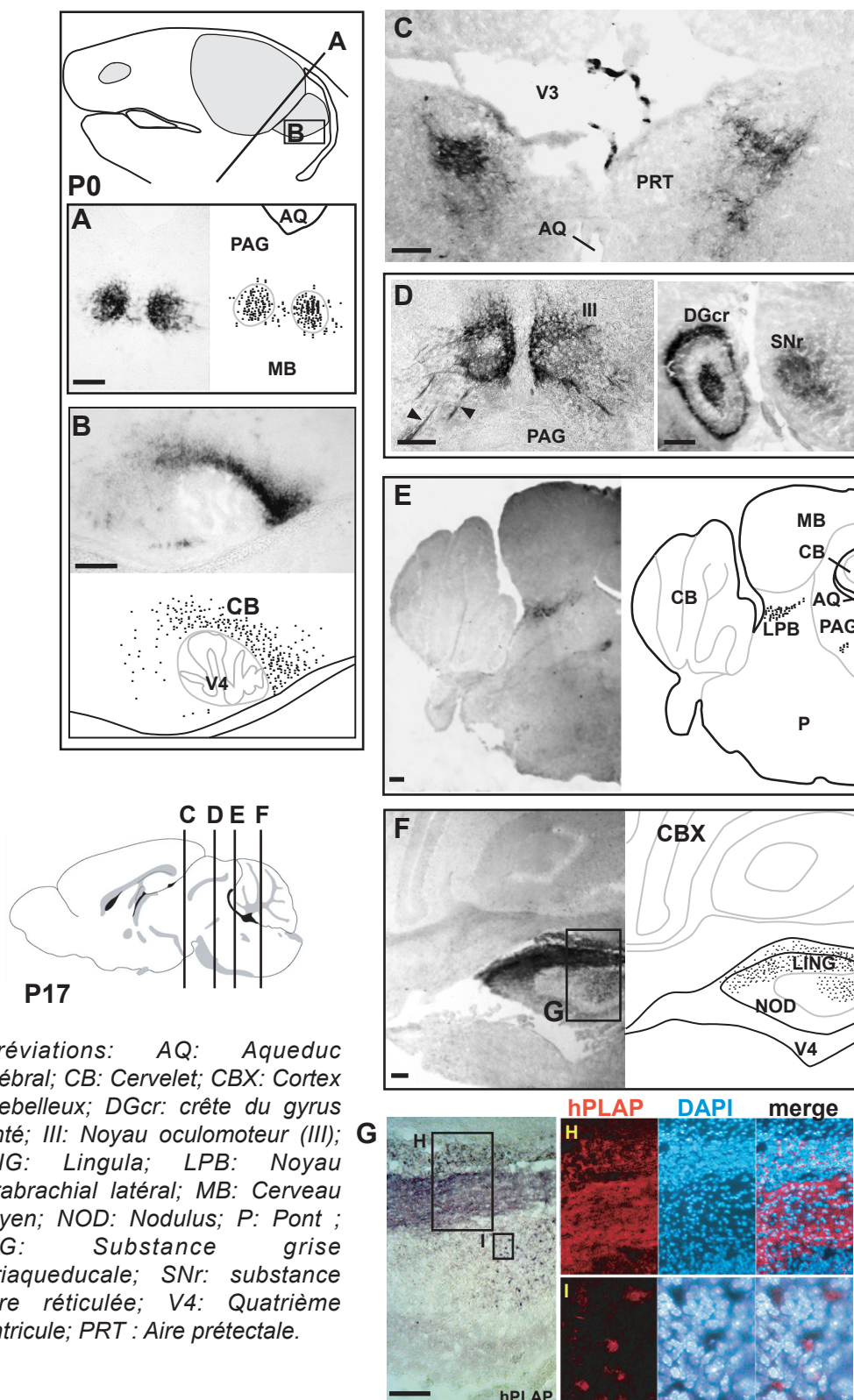
Comme l'illustrent les résultats obtenus au laboratoire dans l'hypophyse puis dans les sites d'expression extra-hypophysaires au cours de cette étude, la grande sensibilité de détection de



**Figure 22 :**  
**Expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans le cerveau antérieur**

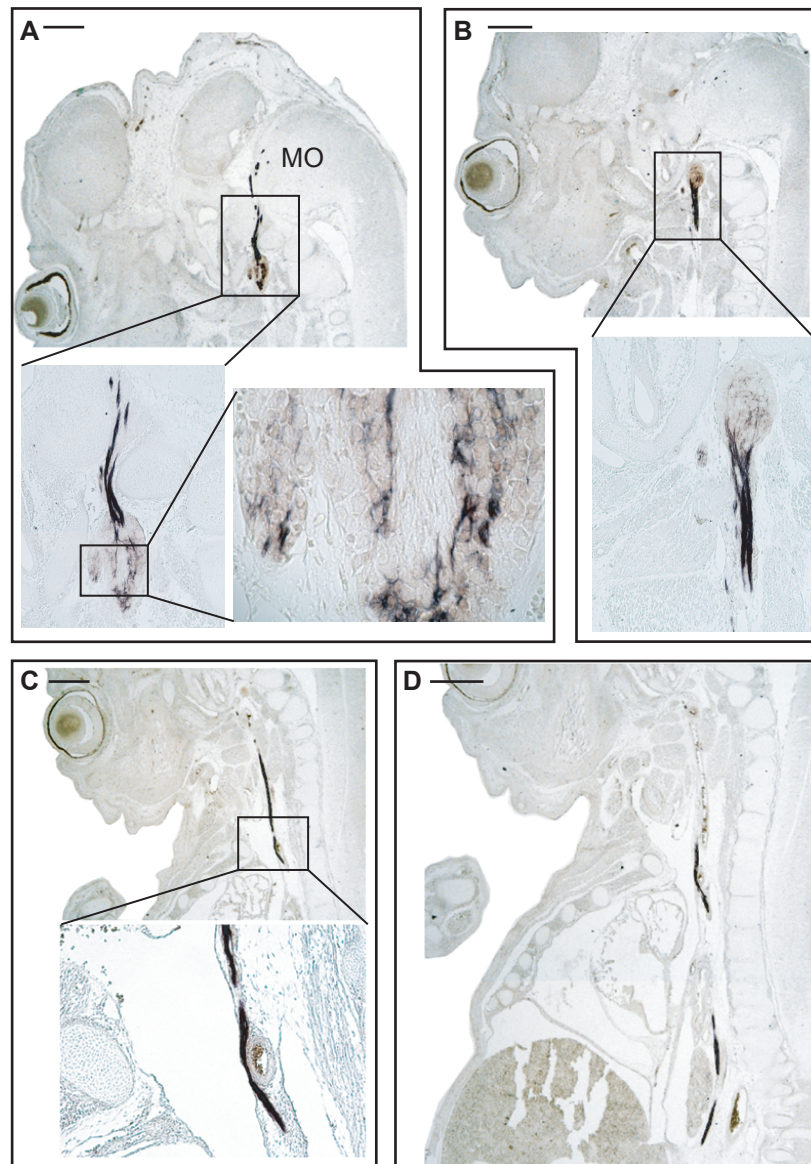
L'activité hPLAP correspondant à l'activité promotrice du *Rgnrh* a été révélée sur des coupes coronales de cerveaux de rats mâles à P17 comme décrit précédemment (partie IV / 2-Article 2). Le marquage a été observé dans le caudoputamen (CP), dans une portion latérale à proximité du corps calleux. L'activité hPLAP a également été détectée dans le claustrum (CLA), la couche 6 de l'isocortex (6b) et dans les parties dorsales de la taenia tecta (TTd) et du noyau endopyriforme (EPd). Les coupes A, B, C se succèdent selon une orientation rostro-caudale.

Autres abréviations : LS: Septum latéral ; ACB: Noyau accumbens ; fa: corps calleux, forceps antérieur ; ac: commissure antérieure.



**Figure 23 :**  
**Expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans les cerveaux moyen et postérieur**

L'expression du transgène a été révélée sur coupes coronale (A) ou parasagittale (B) de têtes à P0 ou sur des coupes coronales de cerveaux à P17 (C-F). Expression du transgène: A, dans les noyaux oculomoteurs; B, dans le cervelet bordant le 4ème ventricule; C, dans l'aire prétectale; D, dans les noyaux oculomoteurs et les fibres émergeant de ces noyaux (à gauche) ; dans le gyrus denté et la substance noire (à droite). E, dans le noyau parabrachial latéral et la substance grise périaqueducale; F-I, dans le cervelet. Echelle : 200 μm.



**Figure 24 :**  
**Expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans le nerf vague (X)**

L'expression du transgène a été révélée sur coupes parasagittales d'embryon à E15,5. Le plan de coupe se rapproche progressivement du plan sagittal dans les sections A à D. Les différents plans permettent de suivre l'allongement antéro-postérieur des fibres marquées, depuis la *medulla oblongata* (MO) jusqu'à la périphérie. Echelle : 500  $\mu$ m.



l'activité hPLAP mais surtout la possibilité de révéler cette activité *in situ* avec une haute résolution permettent une analyse fine de la localisation cellulaire de l'expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* (voir V-4.Article 4). En outre, du fait de son ancrage à la membrane, l'enzyme hPLAP semble constituer un modèle pertinent pour le suivi de l'expression d'un récepteur transmembranaire tel que le RGNRH. Le marquage continu de plusieurs trajets nerveux, à savoir le trajet hippocampo-septal, les projections oculomotrices et le nerf vague, illustre l'un des avantages majeurs du modèle transgénique *Rgnrh-hPLAP*, qui permet de suivre l'expression du gène rapporteur le long de fibres nerveuses, vraisemblablement grâce à un transport de l'enzyme dans les prolongements neuronaux. Ce système permet non seulement de suivre précisément la répartition spatiale d'expression du transgène mais également de déterminer aisément le patron temporel d'activation du promoteur au cours du développement. Le promoteur du *Rgnrh* de rat semble ainsi être majoritairement activé dans des structures nerveuses, de façon différée après la naissance dans le cerveau antérieur, incluant des structures d'origine télencéphalique (cortex, hippocampe, septum, amygdale...) et diencephalique (hypothalamus). Dans certaines structures nerveuses plus postérieures, l'activation du transgène est parfois visible très tôt au cours de la vie embryonnaire dès E12,5, comme c'est le cas des noyaux oculomoteurs mésencéphaliques, des nerfs oculomoteurs (III), du cervelet et des nerfs vagues (X). Par ailleurs, plusieurs structures de nature glandulaire sont également marquées dès la vie embryonnaire, à savoir l'hypophyse antérieure (E13,5), le testicule (E12) et la glande pinéale (E12,5). La comparaison de ces différents contextes d'expression pourrait faciliter l'identification des facteurs induisant l'activation du promoteur du *Rgnrh* et, dans certains cas, réprimant l'expression du transgène jusqu'à la période postnatale.

Le transgène est dirigé par une région 5' bien définie du gène d'intérêt. Ce type d'approche est, de ce fait, utilisé pour délimiter la région promotrice active *in vivo* dans un contexte cellulaire donné (Granger *et al.*, 2004). Néanmoins, les régions d'ADN entourant le site d'insertion sont, en théorie, susceptibles de modifier l'expression du gène rapporteur et donc la régulation spécifique du promoteur. L'une des limites de ce modèle en tant qu'outil d'investigation des sites d'expression du *Rgnrh* réside dans l'existence potentielle de différences entre le patron d'expression du transgène et celui du gène endogène, recouvrant deux types de situations : 1/ une expression ectopique du transgène dans un site n'exprimant pas le *Rgnrh* ; 2/ l'absence d'expression du transgène dans un site d'expression avéré du *Rgnrh*. La première situation pourrait être liée à l'absence d'éléments répresseurs dans le transgène présents dans le locus du gène endogène, ou encore à l'influence d'éléments activateurs de la transcription à proximité du site d'insertion. La deuxième situation, illustrée par le cas de l'ovaire dans notre modèle *Rgnrh-hPLAP*, pourrait refléter l'implication d'un promoteur alternatif. En effet, le promoteur de 3,3 kb de rat n'est pas capable d'induire l'expression de l'hPLAP dans l'ovaire, alors que l'expression du *Rgnrh* y est bien établie (voir § III / 3.1). La situation peut parfois atteindre un haut degré de complexité, comme l'illustre bien le cas du gène *Sf1*, dont l'expression dans la poche de Rathke nécessite la présence d'un enhancer intronique spécifique (voir § V / 1.1.5). Certaines des situations évoquées ci-dessus font référence à une influence du site d'insertion sur l'expression du transgène. A l'inverse, le transgène pourrait avoir des conséquences inattendues et non maîtrisables en modifiant les propriétés de son locus d'insertion, par exemple en

interrompant une phase ouverte de lecture. Afin d'éliminer les risques d'interprétations erronées, il est préférable de vérifier que les caractéristiques d'expression du transgène sont identiques dans plusieurs lignées portant le même transgène (Granger *et al.*, 2004). De plus, la validation des résultats dans chaque site d'expression devrait être appuyée par des approches complémentaires permettant de corréler l'expression du transgène et la transcription du gène endogène, comme nous l'avons systématiquement réalisé dans les sites d'expression extra-hypophysaires étudiés.

Chez les Mammifères, les techniques de transgénèse ont été développées et appliquées essentiellement chez la souris. Dans le modèle murin *Rgnrh-hPLAP*, le promoteur de rat est capable d'induire une expression adéquate du transgène dans les cellules gonadotropes de souris, démontrant que la proximité entre ces espèces est suffisante pour conserver la spécificité gonadotrope d'activation du promoteur. Consolidant cette idée et élargissant sa portée au-delà du groupe des Rongeurs, le promoteur ovin du *Rgnrh* est également activé de façon prépondérante dans l'hypophyse de souris (Duval *et al.*, 2000, voir également V-4.Article 4). Ainsi, les différents facteurs nucléaires de types généraux (ie : complexe d'initiation de la transcription) comme de types plus spécifiques des cellules gonadotropes murines sont capables non seulement d'induire l'expression du *Rgnrh* endogène par définition mais également d'activer les promoteurs ovin et de rat, validant ainsi l'approche de transgénèse chez la souris pour étudier les propriétés d'un promoteur d'une autre espèce de Mammifère. Plus surprenant, nous avons constaté que certaines caractéristiques de l'expression du transgène reflètent l'expression du gène endogène chez le rat sans que ces propriétés soient toutes partagées chez la souris. Plus précisément, nous ne sommes pas parvenus à détecter le transcrit du *Rgnrh* dans l'hippocampe de souris par RT-PCR. Dans l'hypothèse où ce résultat refléterait bien l'absence d'expression du *Rgnrh* dans l'hippocampe de souris, cela laisserait supposer que le promoteur de rat, en induisant l'expression du transgène *Rgnrh-hPLAP*, se comporte chez la souris comme dans l'hippocampe de rat. Cette donnée suggère que l'origine du promoteur est prépondérante sur l'origine du contexte nucléaire pour déterminer le statut d'activation du promoteur dans un tissu homologue. En ce sens, nos données sont cohérentes avec les observations réalisées à plus grande échelle chez un modèle murin portant un chromosome 21 humain additionnel (Wilson *et al.*, 2008). Dans les hépatocytes de ces souris, la fixation de facteurs de transcription, les régions d'initiation de la transcription, les empreintes épigénétiques et l'expression génique, observées sur toute la longueur du chromosome humain, reproduisent les résultats obtenus dans les hépatocytes humains. En parallèle, la région homologue chez la souris, comme attendu, continue de se comporter selon un profil murin. Les différences observées sont donc d'abord liées à la séquence génétique. En accord avec ces données, l'expression du transgène *Rgnrh-hPLAP* dans l'hippocampe de souris suggère que la séquence promotrice joue un rôle dominant sur le contexte nucléaire dans l'induction de programmes transcriptionnels. Ces données renforcent encore davantage la pertinence de l'approche de transgénèse chez la souris comme outil d'investigation des processus de régulation génique mis en jeu chez d'autres espèces apparentées.

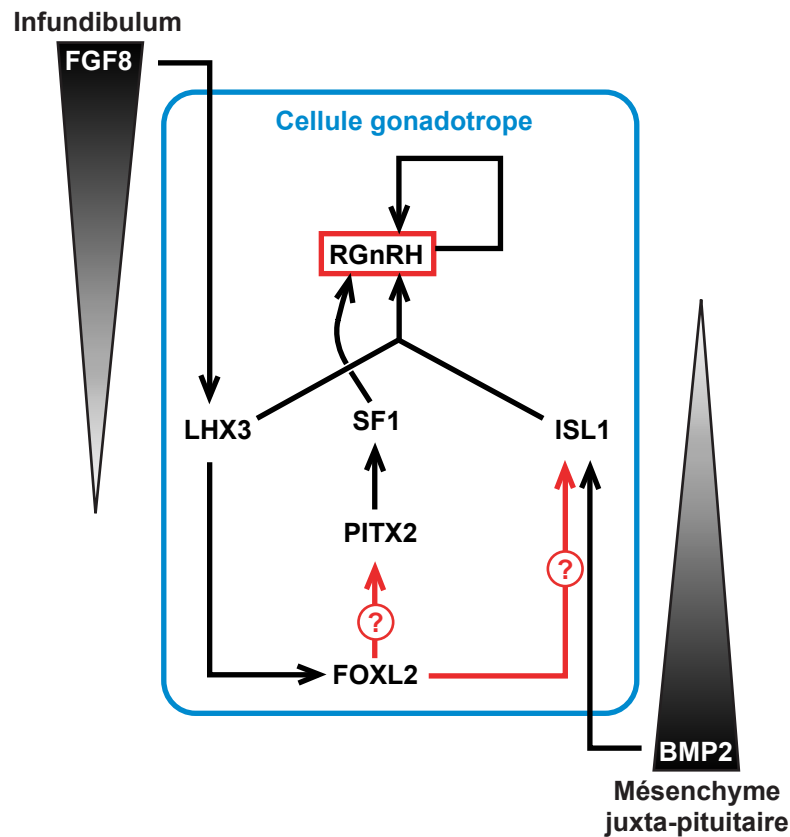


## VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en relief les multiples facettes que revêt l'étude de l'expression d'un gène tel que le *Rgnrh*, qui présente la particularité d'être exprimé dans de multiples sites, mais de façon ciblée dans certains types cellulaires et selon une cinétique propre à chaque tissu. Ce récepteur, qui, dans l'hypophyse adulte, joue un rôle crucial dans la fonction de reproduction, pourrait ainsi être impliqué dans plusieurs autres processus physiologiques au cours du développement et chez l'adulte.

L'étude de la combinatoire transcriptionnelle régulant l'expression du *Rgnrh* dans les cellules gonadotropes est intimement liée à la connaissance des mécanismes régulant l'ontogenèse hypophysaire. Dès E13,5, le promoteur du *Rgnrh* pourrait être activé par l'hétérodimère de protéines LIM-HD, ISL1/LHX3 (Granger *et al.*, 2006). Il est bien établi que ces deux facteurs sont exprimés précocement dans la poche de Rathke sous l'influence de gradients transitoires de molécules signalisatrices extrinsèques de type FGF et/ou BMP. En revanche, une fois ces gradients dissipés, les mécanismes assurant le maintien de leur expression de façon autonome restent largement inconnus. L'un des objectifs actuels de l'équipe consiste à identifier certaines des boucles régulatrices en jeu, dont la connaissance pourrait contribuer à retracer la cascade des événements moléculaires aboutissant à l'expression du *Rgnrh*. Des données récentes acquises au laboratoire laissent penser que le facteur Forkhead FOXL2 pourrait jouer un rôle pivot dans ce processus. En particulier, une approche visant à identifier les cibles de FOXL2 par immunoprécipitation de la chromatine couplée à une analyse par puce à ADN (ou « ChIP on chip ») a permis de mettre en évidence la présence de FOXL2 sur le promoteur du gène codant ISL1 dans la lignée gonadotrope  $\alpha$ T3-1. Cette information suggère que FOXL2, dont l'expression serait régulée par LHX3 (Ellsworth *et al.*, 2006), pourrait participer à la régulation de l'expression d'*Isl1*. L'identification d'une seconde cible potentielle de FOXL2, *Pitx2*, pourrait contribuer à mettre en lumière les événements aboutissant à l'expression de SF1, dont le gène possède un élément de réponse intronique pour PITX2 chez la souris (Shima *et al.*, 2008). L'analyse de ces données préliminaires permet ainsi de dresser un schéma hypothétique des régulations en jeu dans l'émergence du lignage gonadotrope et de l'expression du *Rgnrh* (**Figure 25**). Ces hypothèses doivent être testées par plusieurs approches complémentaires dans le but de déterminer si la fixation de FOXL2 sur les promoteurs d'*Isl1* et de *Pitx2* est effectivement associée à un effet régulateur, et, le cas échéant, de caractériser la réponse de ces gènes à ce facteur.

Nos analyses ont révélé que des facteurs communs à plusieurs tissus comme CREB ou OTX2 s'associent avec des partenaires différents et interagissent avec des éléments de réponse variables suivant les tissus. Cette souplesse et cette adaptation des combinatoires transcriptionnelles pourraient permettre d'expliquer comment le gène du récepteur peut s'exprimer spécifiquement dans plusieurs types cellulaires en utilisant un seul et même promoteur. Ces données éclairent d'un jour nouveau ce que révèle l'analyse théorique de cette séquence promotrice. Sur les 33 TAAT mis en évidence sur le promoteur de 1,1 kb, motifs de reconnaissance pour les facteurs à homéodomaine, seuls 6 se sont



**Figure 25 :**  
**Perspectives : émergence et maintien des marqueurs de**  
**différenciation du lignage gonadotrope**

Les gradients morphogénétiques (FGF/BMP) induisent précocement l'expression de facteurs de transcription dans la poche de Rathke, dont certains persistent au cours du développement et chez l'adulte. FGF8 induit l'expression de LHX3, qui, à son tour, serait impliqué dans la régulation de *Foxl2* ainsi que du *Rgnrh*, en association avec ISL1, précocement induit par BMP4/2. PITX2 régulerait l'expression de SF1, qui joue un rôle essentiel dans l'expression des gènes marqueurs du lignage gonadotrope, incluant le *Rgnrh*. FOXL2, qui interagit avec les promoteurs de *Pitx2* et *Isl1* *in vivo*, pourrait être impliqué dans le maintien de l'expression de ces deux facteurs, et pourrait ainsi participer à la cascade des événements moléculaires qui induisent et modulent l'expression du *Rgnrh* au cours du développement et chez l'adulte.

révélés fonctionnels dans les cellules gonadotropes. Dans un contexte non gonadotrope, et potentiellement dans la rétine et la glande pinéale, un septième site serait fonctionnel. On peut penser que des TAAT fonctionnels supplémentaires seront découverts dans les autres tissus où le récepteur s'exprime, notamment l'hippocampe. Plus généralement, l'analyse théorique de la séquence promotrice révèle une profusion d'éléments de réponse potentiels à toutes sortes de facteurs de transcription. Il est très improbable que tous ces sites soient utilisés dans un seul et unique tissu, rendant assez déroutants les résultats de ce type d'analyse. Mais, si l'on prend la peine de considérer le nombre de tissus, normaux ou pathologiques, où le RGnRH s'exprime comme cela est rapporté dans la littérature, alors non seulement ces résultats théoriques deviennent sensés, pouvant fournir des pistes sérieuses à des analyses plus poussées des combinaisons transcriptionnelles mais surtout ils se corrèlent avec l'apparente capacité de ce récepteur à s'exprimer non seulement dans de multiples tissus mais aussi, sous diverses formes, dans une grande partie du règne animal.

Hors de l'hypophyse, l'hippocampe constitue sans doute le site d'expression du RGnRH qui suscite le plus grand intérêt. Cette région du cerveau joue des rôles essentiels dans les processus de mémorisation et d'apprentissage, ainsi que dans le codage des informations spatiales, processus qui sont associés à une intense plasticité synaptique. L'implication de plusieurs neuropeptides dans la modulation de ces fonctions, tels que la galanine ou la somatostatine, a pu être mise en évidence (Dutar *et al.*, 2002, Ogren *et al.*, 2010). Or, dans ce domaine, le rôle de la GnRH n'a pas été exploré à ce jour, et constitue ainsi un sujet d'étude particulièrement intéressant, qui nécessiterait notamment la mise en œuvre d'approches comportementales. D'autre part, la maladie d'Alzheimer, qui affecte un nombre croissant de personnes dans les pays développés, focalise l'attention de nombreux groupes de recherche, ayant pour objectifs majeurs d'élucider les mécanismes physiopathologiques de ce syndrome dans le but ultime d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est probablement dans ce contexte que l'étude des rôles potentiels du RGnRH hippocampique est la plus prometteuse. En effet, certaines observations ont conduit à évaluer l'influence des stéroïdes sexuels, puis celle des hormones gonadotropes, dans le développement de cette pathologie (Webber *et al.*, 2007). En revanche, aucune étude n'a été menée pour déterminer les effets potentiels directs de la GnRH sur le développement de la maladie, et plus généralement, dans les processus liés au vieillissement cérébral, bien que l'expression du RGnRH soit clairement établie dans l'hippocampe et dans d'autres structures du cerveau. Cet aspect ouvre des perspectives d'intérêt majeur concernant les implications physiologiques de la présence du récepteur dans ces tissus.

## VIII. ANNEXE : table des facteurs de transcription

Facteur (nom officiel)	Signification de l'abréviation	OMIM Identification
<b>BMAL1 (ARNTL)</b>	Brain and Muscle ARNT-like protein 1	<a href="#">602550</a>
<b>c-FOS</b>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	<a href="#">164810</a>
<b>c-JUN</b>	V-Jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	<a href="#">165160</a>
<b>CLOCK</b>	Circadian Locomotor Outpout Cycles Kaput	<a href="#">601851</a>
<b>CREB</b>	cAMP Response Element-Binding protein 1	<a href="#">123810</a>
<b>CRX</b>	Cone-Rod Homeobox factor	<a href="#">602225</a>
<b>EGR1 / NGF1A</b>	Early Growth Response 1	<a href="#">128990</a>
<b>HESX1 / RPX</b>	Homeobox Expressed in ES Cells	<a href="#">601802</a>
<b>FOXL2</b>	Forkhead transcription factor 2	<a href="#">605597</a>
<b>GATA2</b>	GATA-Binding protein 2	<a href="#">137295</a>
<b>GATA3</b>	GATA-Binding protein 3	<a href="#">131320</a>
<b>GATA4</b>	GATA-Binding protein 4	<a href="#">600576</a>
<b>GATA5</b>	GATA-Binding protein 5	<a href="#">611496</a>
<b>GATA6</b>	GATA-Binding protein 6	<a href="#">601656</a>
<b>ISL1</b>	Islet 1	<a href="#">600366</a>
<b>ISL2</b>	Islet 2	<a href="#">609481</a>
<b>LHX2</b>	LIM/Homeobox protein 2	<a href="#">603759</a>
<b>LHX3</b>	LIM/Homeobox protein 3	<a href="#">600577</a>
<b>LHX4</b>	LIM/Homeobox protein 4	<a href="#">602146</a>
<b>LHX5</b>	LIM/Homeobox protein 5	<a href="#">605992</a>
<b>LHX9</b>	LIM/Homeobox protein 9	<a href="#">606066</a>
<b>MASH1 (ASCL1)</b>	Mammalian Achaete-Scute Homolog	<a href="#">100790</a>
<b>NAB1</b>	NGF1A-Binding protein 1	<a href="#">600800</a>
<b>NAB2</b>	NGF1A-Binding protein 2	<a href="#">602381</a>
<b>NEUROD1</b>	Neurogenic Differentiation 1	<a href="#">601724</a>
<b>NFY</b>	Nuclear Transcription Factor Y ; A : <a href="#">189903</a> / B : <a href="#">189904</a> / C : <a href="#">605344</a>	
<b>NUR77 / NGF1B (NR4A1)</b>	Nuclear Receptor 77	<a href="#">139139</a>
<b>OCT1 (POU2F1)</b>	Octamer-binding transcription factor 1	<a href="#">164175</a>
<b>OTX1</b>	Orthodenticle-related protein 1	<a href="#">600036</a>
<b>OTX2</b>	Orthodenticle-related protein 2	<a href="#">600037</a>
<b>PAX6</b>	Paired-box factor 6	<a href="#">607108</a>
<b>PIT1 (POU1F1)</b>	Pituitary-specific transcription factor	<a href="#">173110</a>
<b>PITX1</b>	Pituitary homeobox 1	<a href="#">602149</a>
<b>PITX2</b>	Pituitary homeobox 2	<a href="#">601542</a>
<b>PROP1</b>	Prophet of PIT1	<a href="#">601538</a>
<b>SF1 (NR5A1)</b>	Steroidogenic Factor 1	<a href="#">184757</a>
<b>REST/NRSF</b>	RE-1 Silencing Transcription Factor	<a href="#">600571</a>
<b>SIX3</b>	Sine oculis homeobox homolog 3	<a href="#">603714</a>
<b>TPIT (TBX19)</b>	T-box pituitary transcripition factor	<a href="#">604614</a>

## IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**A**campora D, Mazan S, Tuorto F, Avantiato V, Tremblay JJ, Lazzaro D, di Carlo A, Mariano A, Macchia PE, Corte G, Macchia V, Drouin J, Brûlet P, Simeone A (1998) Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking Otx1 reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* 125:1229-1239

Aikawa S, Sato T, Ono T, Kato T, Kato Y (2006) High level expression of Prop-1 gene in gonadotropic cell lines. *J Reprod Dev* 52:195-201

Albarracín CT, Kaiser UB, Chin WW (1994) Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Endocrinology* 135:2300-2306

Albarracín CT, Frosch MP, Chin WW (1999) The gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter directs pituitary-specific oncogene expression in transgenic mice. *Endocrinology* 140:2415-2421

Albertson AJ, Navratil A, Mignot M, Dufourny L, Cherrington B, Skinner DC (2008a) Immunoreactive GnRH type I receptors in the mouse and sheep brain. *J Chem Neuroanat* 35:326-333

Albertson AJ, Talbott H, Wang Q, Jensen D, Skinner DC (2008b) The gonadotropin-releasing hormone type I receptor is expressed in the mouse cerebellum. *Cerebellum* 7:379-384

Alonso A, Köhler C (1982) Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett* 31:209-214

Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun* 44:205-210

Andrews WV, Staley DD, Huckle WR, Conn PM (1986) Stimulation of luteinizing hormone (LH) release and phospholipid breakdown by guanosine triphosphate in permeabilized pituitary gonadotropes: antagonist action suggests association of a G protein and gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* 119:2537-2546

**B**ach I, Carrière C, Ostendorff HP, Andersen B, Rosenfeld MG (1997) A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev* 11:1370-1380

Badaloni A, Bonanomi D, Albieri I, Givogri I, Bongarzone E, Valtorta F, Consalez GG (2007) Transgenic mice expressing a dual, CRE-inducible reporter for the analysis of axon guidance and synaptogenesis. *Genesis* 45:405-412

Badr M, Pelletier G (1987) Characterization and autoradiographic localization of LHRH receptors in the rat brain. *Synapse* 1:567-571

Badr M, Marchetti B, Pelletier G (1988) Modulation of hippocampal LHRH receptors by sex steroids in the rat. *Peptides* 9:441-442

Bahk JY, Hyun JS, Chung SH, Lee H, Kim MO, Lee BH, Choi WS (1995) Stage specific identification of the expression of GnRH mRNA and localization of the GnRH receptor in mature rat and adult human testis. *J Urol* 154:1958-1961

Bambino TH, Schreiber JR, Hsueh AJ (1980) Gonadotropin-releasing hormone and its agonist inhibit testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in immature and adult hypophysectomized rats. *Endocrinology* 107:908-917

Ban E, Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Leblanc P, Heurtier JF, Drieu K, Fillion G, Haour F (1990) GnRH receptors in rat brain, pituitary and testis; modulation following surgical and gonadotropin-releasing hormone agonist-induced castration. *Mol Cell Endocrinol* 70:99-107

Baram T, Koch Y, Hazum E, Fridkin M (1977) Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science* 198:300-302

Barnhart KM, Mellon PL (1994) The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 8:878-885

- Batticane N, Morale MC, Gallo F, Farinella Z, Marchetti B (1991)** Luteinizing hormone-releasing hormone signaling at the lymphocyte involves stimulation of interleukin-2 receptor expression. *Endocrinology* 129:277-286
- Bauer-Dantoin AC, Hollenberg AN, Jameson JL (1993)** Dynamic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the anterior pituitary gland during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 133:1911-1914
- Bauer-Dantoin AC, Jameson JL (1995)** Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 136:4432-4438
- Bauer-Dantoin AC, Weiss J, Jameson JL (1995)** Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* 136:1014-1019
- Beauvillain JC (2008)** Le cerveau et la reproduction : le réseau neuronal à GnRH. *MT / médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie* Volume 10, Numéro 2, 94-104
- Bédécarrats GY, Kaiser UB (2007)** Mutations in the human gonadotropin-releasing hormone receptor: insights into receptor biology and function. *Semin Reprod Med* 25:368-378
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978)** Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202:631-633
- Belisle S, Guevin JF, Bellabarba D, Lehoux JG (1984)** Luteinizing hormone-releasing hormone binds to enriched human placental membranes and stimulates in vitro the synthesis of bioactive human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 59:119-126
- Belsham DD, Evangelou A, Roy D, Duc VL, Brown TJ (1998)** Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression by 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone in GnRH-secreting GT1-7 hypothalamic neurons. *Endocrinology* 139:1108-1114
- Benard O, Naor Z, Seger R (2001)** Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 276:4554-4563
- Benayoun BA, Georges AB, L'hôte D, Andersson N, Dipietromaria A, Todeschini AL, Caburet S, Bazin C, Anttonen M, Veitia RA (2011)** Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol Genet* [Epub ahead of print]
- Benoît J, Assenmacher I (1952)** Influence of high and low lesions of the infundibulum on gonad stimulation in the domestic drake. *C R Hebd Seances Acad Sci* 235:1547-1549
- Besecke LM, Guendner MJ, Schneyer AL, Bauer-Dantoin AC, Jameson JL, Weiss J (1996)** Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone-beta gene expression through an activin/follistatin autocrine or paracrine loop. *Endocrinology* 137:3667-3673
- Bhati M, Lee C, Nancarrow AL, Lee M, Craig VJ, Bach I, Guss JM, Mackay JP, Matthews JM (2008)** Implementing the LIM code: the structural basis for cell type-specific assembly of LIM-homeodomain complexes. *EMBO J* 27:2018-2029
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ (1994)** Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134:245-252
- Boepple PA, Mansfield MJ, Crawford JD, Crigler JF Jr, Blizzard RM, Crowley WF Jr (1990)** Gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment of central precocious puberty: an analysis of growth data in a developmental context. *Acta Paediatr Scand Suppl* 367:38-43
- Bonfil D, Chuderland D, Kraus S, Shahbazian D, Friedberg I, Seger R, Naor Z (2004)** Extracellular signal-regulated kinase, Jun N-terminal kinase, p38, and c-Src are involved in gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Endocrinology* 145:2228-2244
- Botté MC, Chamagne AM, Carré MC, Counis R, Kottler ML (1998)** Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* 159:179-189
- Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J (2009)** Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 360:2742-2748
- Bourne GA, Regiani S, Payne AH, Marshall JC (1980)** Testicular GnRH receptors--characterization and localization on interstitial tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 51:407-409

**Bowen RL, Isley JP, Atkinson RL (2000)** An association of elevated serum gonadotropin concentrations and Alzheimer disease? *J Neuroendocrinol* 12:351-354

**Bowen RL, Smith MA, Harris PL, Kubat Z, Martins RN, Castellani RJ, Perry G, Atwood CS (2002)** Elevated luteinizing hormone expression colocalizes with neurons vulnerable to Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci Res* 70:514-518

**Bowen RL, Verdile G, Liu T, Parlow AF, Perry G, Smith MA, Martins RN, Atwood CS (2004)** Luteinizing hormone, a reproductive regulator that modulates the processing of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta deposition. *J Biol Chem* 279:20539-20545

**Boyle TA, Belt-Davis DI, Duello TM (1998)** Nucleotide sequence analyses predict that human pituitary and human placental gonadotropin-releasing hormone receptors have identical primary structures. *Endocrine* 9:281-287

**Braden TD, Farnworth PG, Burger HG, Conn PM (1990)** Regulation of the synthetic rate of gonadotropin-releasing hormone receptors in rat pituitary cell cultures by inhibin. *Endocrinology* 127:2387-2392

**Braden TD, Conn PM (1992)** Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 130:2101-2105

**Brooks J, Taylor PL, Saunders PT, Eidne KA, Struthers WJ, McNeilly AS (1993)** Cloning and sequencing of the sheep pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor and changes in expression of its mRNA during the estrous cycle. *Mol Cell Endocrinol* 94:R23-27

**Bull P, Morales P, Huyser C, Socías T, Castellón EA (2000)** Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 6:582-586

**Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Haisenleder DJ, Marshall JC (2002)** GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 143:3243-3249

**C**ampbell RK, Satoh N, Degnan BM (2004) Piecing together evolution of the vertebrate endocrine system. *Trends Genet* 20:359-366

**Campion CE, Turzillo AM, Clay CM (1996)** The gene encoding the ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: cloning and initial characterization. *Gene* 170:277-280

**Candiani S, Holland ND, Oliveri D, Parodi M, Pestarino M (2008)** Expression of the amphioxus Pit-1 gene (AmphiPOU1F1/Pit-1) exclusively in the developing preoral organ, a putative homolog of the vertebrate adenohypophysis. *Brain Res Bull* 75:324-330

**Caraty A, Duittoz A, Pelletier J, Thiéry JC, Tillet Y, Bouchard P (2001)** Libération pulsatile des gonadotropines, de la prolactine et de la GH. Le contrôle de la pulsatilité de LH. In : « La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme », C Thibault, MC Levasseur, ed Ellipse, Chap 4, pages 85-98

**Caraty A, Skinner DC (2008)** Gonadotropin-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid: endogenous distribution and exogenous uptake. *Endocrinology* 149:5227-5234

**Casadesus G, Webber KM, Atwood CS, Pappolla MA, Perry G, Bowen RL, Smith MA (2006)** Luteinizing hormone modulates cognition and amyloid-beta deposition in Alzheimer APP transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 1762:447-452

**Casañ EM, Raga F, Polan ML (1999)** GnRH mRNA and protein expression in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 5:234-239

**Casañ EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML (2000)** Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1377-1381

**Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, Chiappa SA, Fink G (1977)** Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269:338-340

**Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hökfelt T (1993)** Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11292-11296

- Cedars MI, Lu JK, Meldrum DR, Judd HL (1990)** Treatment of endometriosis with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist plus medroxyprogesterone acetate. *Obstet Gynecol* 75:641-645
- Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley WF Jr, Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB (2009)** GnRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11703-11708
- Charles MA, Suh H, Hjalt TA, Drouin J, Camper SA, Gage PJ (2005)** PITX genes are required for cell survival and Lhx3 activation. *Mol Endocrinol* 19:1893-1903
- Charles MA, Saunders TL, Wood WM, Owens K, Parlow AF, Camper SA, Ridgway EC, Gordon DF (2006)** Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol Endocrinol* 20:1366-1277
- Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok S, Williams RS (1996)** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3215-3221
- Chen A, Yahalom D, Ben-Aroya N, Kaganovsky E, Okon E, Koch Y (1998)** A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Lett* 435:199-203
- Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M (2002)** The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med* 8:1421-1426
- Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC (1999)** Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 84:743-750
- Chen L, He HX, Sun XD, Zhao J, Liu LH, Huang WQ, Zhang RQ (2004)** Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor and effect of gonadotropin-releasing hormone analogue on proliferation of cultured gastric smooth muscle cells of rats. *World J Gastroenterol* 10:1780-1784
- Chen L, Sun XD, Zhao J, Yang AG, Huang WQ (2005)** Distribution, cloning and sequencing of GnRH, its receptor, and effects of gastric acid secretion of GnRH analogue in gastric parietal cells of rats. *Life Sci* 76:1351-1365
- Chen Y, Wong M, Moss RL (1993)** Effects of a biologically active LHRH fragment on CA1 hippocampal neurons. *Peptides* 14:1079-1081
- Cheng CK, Yeung CM, Chow BK, Leung PC (2002)** Characterization of a new upstream GnRH receptor promoter in human ovarian granulosa-luteal cells. *Mol Endocrinol* 16:1552-1564
- Cheng CK, Leung PC (2005)** Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 26:283-306
- Cherrington BD, Farmerie TA, Lents CA, Cantlon JD, Roberson MS, Clay CM (2005)** Activin responsiveness of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene is mediated by a composite enhancer containing spatially distinct regulatory elements. *Mol Endocrinol* 19:898-912
- Cherrington BD, Farmerie TA, Clay CM (2006)** A specific helical orientation underlies the functional contribution of the activin responsive unit to transcriptional activity of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Endocrine* Jun;29(3):425-33
- Cherrington BD, Bailey JS, Diaz AL, Mellon PL (2008)** NeuroD1 and Mash1 temporally regulate GnRH receptor gene expression in immortalized mouse gonadotrope cells. *Mol Cell Endocrinol* 295:106-114
- Cheung LW, Wong AS (2008)** Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J* 275:5479-5495
- Chi L, Zhou W, Prikozhan A, Flanagan C, Davidson JS, Golembo M, Illing N, Millar RP, Sealton SC (1993)** Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 91:R1-6
- Chou CS, Zhu H, MacCalman CD, Leung PC (2003a)** Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4781-4790



- Chou CS, Tai CJ, MacCalman CD, Leung PC (2003b)** Dose-dependent effects of gonadotropin releasing hormone on matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 and tissue specific inhibitor of metalloproteinases-1 messenger ribonucleic acid levels in human decidual Stromal cells. *in vitro J Clin Endocrinol Metab* 88:680-688
- Clarke IJ, Cummins JT (1982)** The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111:1737-1739
- Clarkson J, Herbison AE (2006)** Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817-5825
- Clay CM, Nelson SE, Digregorio GB, Campion CE, Wiedemann AL, Nett RJ (1995)** Cell-specific expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is conferred by elements residing within 500 bp of proximal 5' flanking region. *Endocrine* 3:615-622
- Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ (1979)** Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282:90-92
- Clayton RN, Katikineni M, Chan V, Dufau ML, Catt KJ (1980)** Direct inhibition of testicular function by gonadotropin-releasing hormone: mediation by specific gonadotropin-releasing hormone receptors in interstitial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4459-4463
- Clayton RN, Catt KJ (1981)** Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 2:186-209
- Clayton RN, Eccleston L, Gossard F, Thalbard JC, Morel G (1992)** Rat granulosa cells express the gonadotrophin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol* 9:189-195
- Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E (2005)** Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 58:151-164
- Conley A, Hinshelwood M (2001)** Mammalian aromatases. *Reproduction* 121:685-695
- Conn PM, Leaños-Miranda A, Janovick JA (2002)** Protein origami: therapeutic rescue of misfolded gene products. *Mol Interv* 2002 2:308-316
- Cordoba-Montoya DA, Carrer HF (1997)** Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res* 778:430-438
- Corpuz PS, Lindaman LL, Mellon PL, Coss D (2010)** FoxL2 Is required for activin induction of the mouse and human follicle-stimulating hormone beta-subunit genes. *Mol Endocrinol* 24:1037-1051
- Counis R, Laverrière JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler ML, Magre S (2005)** Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev* 45:243-254
- Counis R, Laverrière JN, Garrel-Lazayres G, Cohen-Tannoudji J, Larivière S, Bleux C, Magre S (2007)** What is the role of PACAP in gonadotrope function? *Peptides* 28:1797-1804
- Counis R, Garrel G, Laverriere JN, Simon V, Bleux C, Magre S, Cohen-Tannoudji J (2009)** The GnRH receptor and the response of gonadotrope cells to GnRH pulse frequency code. A story of an atypical adaptation of cell function relying on a lack of receptor homologous desensitization. *Folia Histochem Cytobiol* 47:S81-87
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G (2001)** The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27:159-166
- Currie AJ, Fraser HM, Sharpe RM (1981)** Human placental receptors for luteinizing hormone releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 99:332-338
- Cushman LJ, Watkins-Chow DE, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Radak AL, Lloyd RV, Camper SA (2001)** Persistent Prop1 expression delays gonadotrope differentiation and enhances pituitary tumor susceptibility. *Hum Mol Genet* 10:1141-1153

- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC (1989)** The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125:917-924
- Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman AS, Szeto DP, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG (1999)** Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97:587-598
- Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T (2010)** Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756-764
- Davidson JS, Flanagan CA, Zhou W, Becker II, Elario R, Emeran W, Sealfon SC, Millar RP (1995)** Identification of N-glycosylation sites in the gonadotropin-releasing hormone receptor: role in receptor expression but not ligand binding. *Mol Cell Endocrinol* 107:241-245
- Davidson JS, Flanagan CA, Davies PD, Hapgood J, Myburgh D, Elario R, Millar RP, Forrest-Owen W, McArdle CA (1996)** Incorporation of an additional glycosylation site enhances expression of functional human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine* 4:207-212
- Dawid IB, Breen JJ, Toyama R (1998)** LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 14:156-162
- Dellovade TL, King JA, Millar RP, Rissman EF (1993)** Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. *Neuroendocrinology* 58:166-177
- de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E (1997)** A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 337:1597-1602
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003)** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10972-10976
- Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S (2008)** A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4351-4359
- Dolan S, Evans NP, Richter TA, Nolan AM (2003)** Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor in sheep spinal cord. *Neurosci Lett* 346:120-122
- Dos Santos S, Bardet C, Bertrand S, Escriva H, Habert D, Querat B (2009)** Distinct expression patterns of glycoprotein hormone- $\alpha$ 2 and - $\beta$ 5 in a basal chordate suggest independent developmental functions. *Endocrinology* 150:3815-3822
- Drouin J, Lamolet B, Lamonerie T, Lanctôt C, Tremblay JJ (1998)** The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol Cell Endocrinol* 140:31-36
- Duan WR, Ito M, Park Y, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M, Jameson JL (2002)** GnRH regulates early growth response protein 1 transcription through multiple promoter elements. *Mol Endocrinol* 16:221-233
- Ducret E, Anderson GM, Herbison AE (2009)** RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 150:2799-2804
- Dufau ML, Warren DW, Knox GF, Loumaye E, Castellon ML, Luna S, Catt KJ (1984)** Receptors and inhibitory actions of gonadotropin-releasing hormone in the fetal Leydig cell. *J Biol Chem* 259:2896-2899
- Dutar P, Vaillend C, Viollet C, Billard JM, Potier B, Carlo AS, Ungerer A, Epelbaum J (2002)** Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice. *Neuroscience* 112:455-466
- Duval DL, Nelson SE, Clay CM (1997a)** A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 56:160-168
- Duval DL, Nelson SE, Clay CM (1997b)** The tripartite basal enhancer of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene promoter regulates cell-specific expression through a novel GnRH receptor activating sequence. *Mol Endocrinol* 11:1814-1821
- Duval DL, Ellsworth BS, Clay CM (1999)** Is gonadotrope expression of the gonadotropin releasing hormone receptor gene mediated by autocrine/paracrine stimulation of an activin response element? *Endocrinology* 140:1949-1952

**Duval DL, Farris AR, Quirk CC, Nett TM, Hamernik DL, Clay CM (2000)** Responsiveness of the ovine gonadotropin-releasing hormone receptor gene to estradiol and gonadotropin-releasing hormone is not detectable in vitro but is revealed in transgenic mice. *Endocrinology* 141:1001-1010

**Eidne KA, Flanagan CA, Millar RP (1985)** Gonadotropin-releasing hormone binding sites in human breast carcinoma. *Science* 229:989-991

**Eidne KA, Sellar RE, Couper G, Anderson L, Taylor PL (1992)** Molecular cloning and characterisation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Mol Cell Endocrinol* 90:R5-9

**Ellsworth BS, White BR, Burns AT, Cherrington BD, Otis AM, Clay CM (2003a)** c-Jun N-terminal kinase activation of activator protein-1 underlies homologous regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in alpha T3-1 cells. *Endocrinology* 144:839-849

**Ellsworth BS, Burns AT, Escudero KW, Duval DL, Nelson SE, Clay CM (2003b)** The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 206:93-111

**Ellsworth BS, Egashira N, Haller JL, Butts DL, Cocquet J, Clay CM, Osamura RY, Camper SA (2006)** FOXL2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol Endocrinol* 20:2796-2805

**Emons G, Schally AV (1994)** The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 9:1364-1379

**Emons G, Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Kavanagh J, Verschraegen C (2003)** GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 10:291-299

**Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T (1998)** Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125:1005-1015

**Falcone T, Falutz G, Tolis G (1982)** LH-RH-endocrine manipulation in cancer of the prostate. *Biomed Pharmacother* 36:344-248

**Fan NC, Jeung EB, Peng C, Olofsson JI, Krisinger J, Leung PC (1994)** The human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene: cloning, genomic organization and chromosomal assignment. *Mol Cell Endocrinol* 103:R1-6

**Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC (1995)** The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol* 107:R1-8

**Fauconnier JP, Teuwissen B, Thomas K (1978)** Rate of disappearance in plasma of synthetic LH-RH intravenously injected in man. *Gynecol Obstet Invest* 9:229-237

**Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P (2001)** Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8891-8896

**Fernández-Vázquez G, Kaiser UB, Albarracin CT, Chin WW (1996)** Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activine A. *Mol Endocrinol* 10:356-366

**Finch AR, Caunt CJ, Armstrong SP, McArdle CA (2009)** Agonist-induced internalization and downregulation of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C591-600

**Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA (1998)** The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 139:4652-4662

**Flanagan CA, Becker II, Davidson JS, Wakefield IK, Zhou W, Sealfon SC, Millar RP (1994)** Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor confers specificity for arginine 8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 269:22636-22641

**Fraunfelder FT, Edwards R (1995)** Possible ocular adverse effects associated with leuprolide injections. *JAMA* 273:773-774

**Funston RN, Seidel GE Jr (1995)** Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. *Biol Reprod* 53:541-545

**Furr BJ, Nicholson RI (1982)** Use of analogues of luteinizing hormone-releasing hormone for the treatment of cancer. *J Reprod Fertil* 64:529-539

**Gage PJ, Suh H, Camper SA (1999)** Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126:4643-4651

**Gao PP, Zhang JH, Yokoyama M, Racey B, Dreyfus CF, Black IB, Zhou R (1996)** Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11161-11166

**Garrel G, Delahaye R, Hemmings BA, Counis R (1995)** Modulation of regulatory and catalytic subunit levels of cAMP-dependent protein kinase A in anterior pituitary cells in response to direct activation of protein kinases A and C or after GnRH stimulation. *Neuroendocrinology* 62:514-522

**Garrel G, Lerrant Y, Sirioistis C, Bérault A, Magre S, Bouchaud C, Counis R (1998)** Evidence that gonadotropin-releasing hormone stimulates gene expression and levels of active nitric oxide synthase type I in pituitary gonadotrophs, a process altered by desensitization and, indirectly, by gonadal steroids. *Endocrinology* 139:2163-2170

**Ghzi H, Grumolato L, Thouënnon E, Tanguy Y, Turquier V, Vaudry H, Anouar Y (2008)** Role of PACAP in the physiology and pathology of the sympathoadrenal system. *Front Neuroendocrinol* 29:128-141

**Gieske MC, Kim HJ, Legan SJ, Koo Y, Krust A, Chambon P, Ko C (2008)** Pituitary gonadotroph estrogen receptor- $\alpha$  is necessary for fertility in females. *Endocrinology* 149:20-27

**Gill JC, Wadas B, Chen P, Portillo W, Reyna A, Jorgensen E, Mani S, Schwarting GA, Moenter SM, Tobet S, Kaiser UB (2008)** The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal population is normal in size and distribution in GnRH-deficient and GnRH receptor-mutant hypogonadal mice. *Endocrinology* 149:4596-4604

**González-Martínez D, Zmora N, Saligaut D, Zanuy S, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto JA (2004a)** New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 28:1-15

**González-Martínez D, Madigou T, Mañanos E, Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Kah O, Muñoz-Cueto JA (2004b)** Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. *Biol Reprod* 70:1380-1391

**Goto T, Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Sato H, Kudo R (1999)** Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane type 1-MMP expression in corpora lutea, and structural luteolysis in rats. *J Endocrinol* 161:393-402

**Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990)** Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10:1286-1291

**Graham KE, Nusser KD, Low MJ (1999)** LbetaT2 gonadotroph cells secrete follicle stimulating hormone (FSH) in response to active A. *J Endocrinol* 162:R1-5

**Granger A, Ngo-Muller V, Bleux C, Guigon C, Pincas H, Magre S, Daegelen D, Tixier-Vidal A, Counis R, Laverrière JN (2004)** The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* 145:983-993

**Granger A, Bleux C, Kottler ML, Rhodes SJ, Counis R, Laverrière JN (2006)** The LIM-homeodomain proteins Isl-1 and Lhx3 act with steroidogenic factor 1 to enhance gonadotrope-specific activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* 20:2093-2108

**Grasso G, Massai L, De Leo V, Muscettola M (1998)** The effect of LHRH and TRH on human interferon-gamma production in vivo and in vitro. *Life Sci* 62:2005-2014

**Gregory SJ, Kaiser UB (2004)** Regulation of gonadotropins by inhibin and activine. *Semin Reprod Med* 22:253-267

**Grens KE, Greenwood AK, Fernald RD (2005)** Two visual processing pathways are targeted by gonadotropin-releasing hormone in the retina. *Brain Behav Evol* 66:1-9

**Grosse R, Schöneberg T, Schultz G, Gudermann T (1997)** Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol Endocrinol* 11:1305-1318

**Grosse R, Schmid A, Schöneberg T, Herrlich A, Muhn P, Schultz G, Gudermann T (2000a)** Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J Biol Chem* 275:9193-9200

**Grosse R, Roelle S, Herrlich A, Höhn J, Gudermann T (2000b)** Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 275:12251-12260

**Gründker C, Schulz K, Günthert AR, Emons G (2000)** Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor kappaB-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3815-3820

**Gründker C, Völker P, Günthert AR, Emons G (2001)** Antiproliferative signaling of LHRH in human endometrial and ovarian cancer cells through G-protein  $\alpha$ -mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142:2369-2380

**Gründker C, Günthert AR, Millar RP, Emons G (2002)** Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1427-1430

**Habert R, Devif I, Gangnerau MN, Lecerf L (1991)** Ontogenesis of the in vitro response of rat testis to gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol* 82:199-206

**Hapgood JP, Sadie H, van Biljon W, Ronacher K (2005)** Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol* 17:619-638

**Harris D, Reiss N, Naor Z (1997)** Differential activation of protein kinase C  $\delta$  and  $\epsilon$  gene expression by gonadotropin-releasing hormone in  $\alpha$ T3-1 cells. Autoregulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 272:13534-13540

**Harris GW, Jacobsohn D (1952)** Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 139:263-276

**Hawes BE, Barnes S, Conn PM (1993)** Cholera toxin and pertussis toxin provoke differential effects on luteinizing hormone release, inositol phosphate production, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor binding in the gonadotrope: evidence for multiple guanyl nucleotide binding proteins in GnRH action. *Endocrinology* 132:2124-2130

**Hazum E, Cuatrecasas P, Marian J, Conn PM (1980)** Receptor-mediated internalization of fluorescent gonadotropin-releasing hormone by pituitary gonadotropes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6692-6695

**Heber D, Marshall JC, Odell WD (1978)** GnRH membrane binding: identification, specificity, and quantification in nonpituitary tissues. *Am J Physiol* 235:E227-230

**Herbison AE, Pape JR (2001)** New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22:292-308

**Herbison AE, Skynner MJ, Sim JA (2001)** Lack of detection of estrogen receptor- $\alpha$  transcripts in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 142:493

**Hiney JK, Ojeda SR, Dees WL (1991)** Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology* 54:420-423

**Hirabayashi Y, Gotoh Y (2010)** Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci* 11:377-388

**Ho JS, Nagle GT, Mathias JR, Clench MH, Fan X, Kalmaz GD, Sallustio JE, Eaker EY (1996)** Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor mRNA in rat myenteric plexus cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113:817-821

**Horn F, Bilezikjian LM, Perrin MH, Bosma MM, Windle JJ, Huber KS, Blount AL, Hille B, Vale W, Mellon PL (1991)** Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol Endocrinol* 5:347-355

**Horton CD, Halvorson LM (2004)** The cAMP signaling system regulates LH $\beta$  gene expression: roles of early growth response protein-1, SP1 and steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol* 32:291-306

**Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL (2000)** Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 141:3506-3599

**Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabás K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z (2001)** Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 142:3261-3264

**Hrabovszky E, Kalló I, Szlávik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z (2007)** Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2827-2830

**Hsieh KP, Martin TF (1992)** Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol* 6:1673-1681

**Hsueh AJ, Erickson GF (1979a)** Extrapituitary action of gonadotropin releasing hormone: direct inhibition of ovarian steroidogenesis. *Science* 204:854-855

**Hsueh AJ, Erickson GF (1979b)** Extra-pituitary inhibition of testicular function by luteinising hormone releasing hormone. *Nature* 281:66-67

**Hsueh, AJ (1982)** Direct effects of gonadotropin releasing hormone on testicular Leydig cell function. *Ann NY Acad Sci* 383:249-271

**Hsueh AJ, Jones PB (1983)** Gonadotropin releasing hormone: extrapituitary actions and paracrine control mechanisms. *Annu Rev Physiol* 45:83-94

**Huang W, Yao B, Sun L, Pu R, Wang L, Zhang R (2001)** Immunohistochemical and in situ hybridization studies of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor in rat digestive tract. *Life Sci* 68:1727-1734

**Hunter CS, Rhodes SJ (2005)** LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol Biol Rep* 32:67-77

**Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL (1995)** The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9:478-486

**Illing N, Jacobs GF, Becker II, Flanagan CA, Davidson JS, Eales A, Zhou W, Sealfon SC, Millar RP (1993)** Comparative sequence analysis and functional characterization of the cloned sheep gonadotropin-releasing hormone receptor reveal differences in primary structure and ligand specificity among mammalian receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 196:745-751

**Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T (1994)** Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma and endometrium. *Gynecol Oncol* 55:144-148

**Imai A, Takagi H, Horibe S, Fuseya T, Tamaya T (1996)** Coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3249-3253

**Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG (1988)** A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529

**Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL (1994)** The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8:2302-2312

**Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M, Miyai S (2002)** Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem* 110:50-53

**Itoh MT, Hosaka T, Mimuro T, Hamada N, Ishizuka B (2003)** Gonadotropin-releasing hormone increases melatonin release in the pineal gland of the female rat in vitro. *Horm Metab Res* 35:153-157

**Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y, Hisada M, Ukena K, Tsutsui K, Minakata H (2002)** Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1187-1193

**Jacobson JD, Crofford LJ, Sun L, Wilder RL (1998)** Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs. *Neuroendocrinology* 67:117-125

**Japón MA, Rubinstein M, Low MJ (1994)** In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125

**Jennes L, Stumpf WE (1980)** LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 209:239-256

**Jennes L, Dalati B, Conn PM (1988)** Distribution of gonadotropin releasing hormone agonist binding sites in the rat central nervous system. *Brain Res* 452:156-164

**Jennes L, Woolums S (1994)** Localization of gonadotropin releasing hormone receptor mRNA in rat brain. *Endocrine* 2:521-528

**Jennes L, Brame B, Centers A, Janovick JA, Conn PM (1995)** Regulation of hippocampal gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor mRNA and GnRH-stimulated inositol phosphate production by gonadal steroid hormones. *Brain Res Mol Brain Res* 33:104-110

**Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM (1997)** Brain gonadotropin releasing hormone receptors : localization and regulation. *Recent Prog Horm Res* 52:475-490

**Jeong KH, Chin WW, Kaiser UB (2004)** Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Mol Cell Biol* 24:6127-6139

**Jiménez-Liñán M, Rubin BS, King JC (1997)** Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology* 138:4123-4130

**Jones PB, Conn PM, Marian J, Hsueh AJ (1980)** Binding of gonadotropin releasing hormone agonist to rat ovarian granulosa cells. *Life Sci* 27:2125-2132

**Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ (2007)** GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153:346-364

**Kaiser UB, Zhao D, Cardona GR, Chin WW (1992)** Isolation and characterization of cDNAs encoding the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1645-1652

**Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW (1993)** Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology* 133:931-934

**Kaiser UB, Dushkin H, Altherr MR, Beier DR, Chin WW (1994)** Chromosomal localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13 1-q211 and mouse chromosome 5. *Genomics* 20:506-508

**Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD (1992)** Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189:289-295

**Kakar SS, Rahe CH, Neill JD (1993)** Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest Anim Endocrinol* 10:335-342

**Kakar SS, Grantham K, Musgrove LC, Devor D, Sellers JC, Neill JD (1994a)** Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: tissue expression and hormonal regulation of its mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 101:151-157

**Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD (1994b)** The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 106:145-149

**Kakar SS, Jennes L (1995)** Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Lett* 98:57-62

**Kakar SS (1997)** Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 137:183-192

- Kakar SS, Winters SJ, Zacharias W, Miller DM, Flynn S (2003)** Identification of distinct gene expression profiles associated with treatment of LbetaT2 cells with gonadotropin-releasing hormone agonist using microarray analysis. *Gene* 308:67-77
- Kam KY, Jeong KH, Norwitz ER, Jorgensen EM, Kaiser UB (2005)** Oct-1 and nuclear factor Y bind to the SURG-1 element to direct basal and gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated mouse GnRH receptor gene transcription. *Mol Endocrinol* 19:148-162
- Kanda A, Takahashi T, Satake H, Minakata H (2006)** Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biochem J* 395:125-135
- Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PC (2001)** Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142:182-192
- Karges B, Karges W, de Roux N (2003)** Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Hum Reprod Update* 9:523-530
- Katt JA, Duncan JA, Herbon L, Barkan A, Marshall JC (1985)** The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 116:2113-2115
- Kavanaugh SI, Nozaki M, Sower SA (2008)** Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology* 149:3860-3869
- Knobil E (1990)** The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 163:1721-1727
- Kogo H, Kudo A, Park MK, Mori T, Kawashima S (1995)** In situ detection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor mRNA expression in the rat ovarian follicles. *J Exp Zool* 272:62-68
- Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M (2001)** The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636
- Kottler ML, Lorenzo F, Bergametti F, Commerçon P, Souchier C, Counis R (1995)** Subregional mapping of the human gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) gene to 4q between the markers D4S392 and D4S409. *Hum Genet* 96:477-480
- Kottler ML, Bergametti F, Carré MC, Morice S, Decoret E, Lagarde JP, Starzec A, Counis R (1999)** Tissue-specific pattern of variant transcripts of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 140:561-569
- Kovacs M, Schally AV, Csernus B, Rekasi Z (2001)** Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist Cetrorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LH-RH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1829-1834
- Kozłowski GP, Coates PW (1985)** Ependymoneuronal specializations between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res* 242:301-311
- Kraus S, Levy G, Hanoch T, Naor Z, Seger R (2004)** Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH2-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res* 64:5736-5744
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004)** Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24:5913-5921
- Krsmanovic LZ, Stojilković SS, Mertz LM, Tomić M, Catt KJ (1993)** Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3908-3912
- Krsmanovic LZ, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK, Mores N, Navarro CE, Chen HC, Stojilkovic SS, Catt KJ (1999)** Autocrine regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 140:1423-1431
- Krsmanovic LZ, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ (2009)** The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 20:402-408
- Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, MacKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williams SP, Guy RK, Thornton JW, Fletterick RJ, Willson TM, Ingraham HA (2005)** Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120:343-355



**Kumbrink J, Gerlinger M, Johnson JP (2005)** Egr-1 induces the expression of its corepressor Nab2 by activation of the Nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J Biol Chem* 280:42785-42793

**Lahlou N, Roger M, Chaussain JL, Feinstein MC, Sultan C, Toublanc JE, Schally AV, Scholler R (1987)** Gonadotropin and alpha-subunit secretion during long term pituitary suppression by D-Trp6-luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules as treatment of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 65:946-953

**Lahlou N, Carel JC, Chaussain JL, Roger M (2000)** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab Suppl* 1:723-737

**Laloz MR, Detta A, Clayton RN (1988)** Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene in vivo. *Endocrinology* 122:1689-1694

**Lamba P, Fortin J, Tran S, Wang Y, Bernard DJ (2009)** A novel role for the forkhead transcription factor FOXL2 in activin A-regulated follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *Mol Endocrinol* 23:1001-1013

**Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J (2001)** A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859

**Lariviere S, Garrel G, Simon V, Soh JW, Laverriere JN, Counis R, Cohen-Tannoudji J (2007)** Gonadotropin-releasing hormone couples to 3',5'-cyclic adenosine-5'-monophosphate pathway through novel protein kinase Cdelta and -epsilon in LbetaT2 gonadotrope cells. *Endocrinology* 148:1099-1107

**Latouche J, Crumeyrolle-Arias M, Jordan D, Kopp N, Augendre-Ferrante B, Cedard L, Haour F (1989)** GnRH receptors in human granulosa cells: anatomical localization and characterization by autoradiographic study. *Endocrinology* 125:1739-1741

**Laverrière JN, Granger A, Pincas H, Ngô-Muller V, Bleux C, Tixier-Vidal A, Magre S, Guigon C, Daegelen D, Counis R (2004)** [An ambiguous role of steroidogenic factor 1 in the rat GnRH receptor gene expression. Lessons from transgenic mice]. *J Soc Biol* 198:73-79

**Laws SC, Beggs MJ, Webster JC, Miller WL (1990)** Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology* 127:373-380

**Lawson MA, Tsutsumi R, Zhang H, Talukdar I, Butler BK, Santos SJ, Mellon PL, Webster NJ (2007)** Pulse sensitivity of the luteinizing hormone beta promoter is determined by a negative feedback loop involving early growth response-1 and Ngfi-A binding protein 1 and 2. *Mol Endocrinol* 21:1175-1191

**Leaños-Miranda A, Janovick JA, Conn PM (2002)** Receptor-misrouting: an unexpectedly prevalent and rescuable etiology in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4825-4828

**Leaños-Miranda A, Ulloa-Aguirre A, Ji TH, Janovick JA, Conn PM (2003)** Dominant-negative action of disease-causing gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) mutants: a trait that potentially coevolved with decreased plasma membrane expression of GnRHR in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3360-3367

**Leblanc P, Crumeyrolle M, Latouche J, Jordan D, Fillion G, L'Heritier A, Kordon C, Dussailant M, Rostène W, Haour F (1988)** Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 48:482-488

**Lee CY, Ho J, Chow SN, Yasojima K, Schwab C, McGeer PL (2000)** Immunoidentification of gonadotropin releasing hormone receptor in human sperm, pituitary and cancer cells. *Am J Reprod Immunol* 44:170-177

**Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF (1999)** Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107

**Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996)** KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737

**Lee SL, Sadovsky Y, Swirloff AH, Polish JA, Goda P, Gavrilina G, Milbrandt J (1996)** Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273:1219-1221

**Lefebvre FA, Reeves JJ, Seguin C, Massicotte J, Labrie F (1980)** Specific binding of a potent LHRH agonist in rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 20:127-134

**Lefkowitz RJ (1998)** G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273:186673-18680

**Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES (1993)** Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology* 132:2262-2270

**Lents CA, Farmerie TA, Cherrington BD, Clay CM (2009)** Multiple core homeodomain binding motifs differentially contribute to transcriptional activity of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter. *Endocrine* 35:356-364

**Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Moumni M, Blumberg-Tick J, Counis R (1995)** Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 136:2803-2808

**Lescheid DW, Terasawa E, Abler LA, Urbanski HF, Warby CM, Millar RP, Sherwood NM (1997)** A second form of gonadotropin releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* 138:5618-5629

**Levi LN, Ben-Aroya N, Tel-Or S, Palmon A, Burstein Y, Koch Y (1996)** Expression of the gene for the receptor of gonadotropin-releasing hormone in the rat mammary gland. *FEBS Lett* 379:186-190

**Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG (1990)** Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* 347:528-533

**Li WI, Jiao S, Chin PP (1993)** Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in porcine reproductive tissues. *Peptides* 14:543-549

**Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M (2003)** The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* 24:279-295

**Lin LS, Roberts VJ, Yen SS (1995)** Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 80:580-585

**Lin X, Conn PM (1998)** Transcriptional activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH and cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 139:3896-3902

**Lindemans M, Liu F, Janssen T, Husson SJ, Mertens I, Gäde G, Schoofs L (2009)** Adipokinetic hormone signaling through the gonadotropin-releasing hormone receptor modulates egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1642-1647

**Linke R, Pabst T, Frotscher M (1995)** Development of the hippocamposeptal projection in the rat. *J Comp Neurol* 351:602-616

**Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJ (2002)** Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem* 277:32099-32108

**Lovejoy DA (2006)** Elaboration of Neuroendocrine Systems In : « Neuroendocrinology: An Integrated Approach », ed John Wiley & Sons, Chap 4, pages 85-117

**Lozach A, Garrel G, Lerrant Y, Bérault A, Counis R (1998)** GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus. *Mol Cell Endocrinol* 143:43-51

**Lukacs H, Hiatt ES, Lei ZM, Rao CV (1995)** Peripheral and intracerebroventricular administration of human chorionic gonadotropin alters several hippocampus-associated behaviors in cycling female rats. *Horm Behav* 29:42-58

**Madigou T, Mañanos-Sanchez E, Hulshof S, Anglade I, Zanuy S, Kah O (2000)** Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 63:1857-1866

**Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L, Motta M (1999)** Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *Endocrinology* 140:1581-1585

**Maier CC, Marchetti B, LeBoeuf RD, Blalock JE (1992)** Thymocytes express a mRNA that is identical to hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone mRNA. *Cell Mol Neurobiol* 12:447-454

- Malpaux B (2001)** Environnement et rythmes de reproduction In : « La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme », C Thibault, MC Levasseur, ed Ellipse, Chap 31, pages 699-724
- Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson L, Nelson C, Elsholtz H, Rosenfeld MG (1989)** A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 3:946-958
- Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Farinella Z, Cordaro S, Scapagnini U (1989)** Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology* 125:1025-1036
- Maronde E, Stehle JH (2007)** The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab* 18:142-149
- Marshall JC, Shakespear RA, Odell WD (1976)** LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 5:671-677
- Martin B, Golden E, Carlson OD, Egan JM, Mattson MP, Maudsley S (2008)** Caloric restriction: impact upon pituitary function and reproduction. *Ageing Res Rev* 7:209-224
- Martin SJ, Morris RG (2002)** New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12:609-636
- Martínez A, Soriano E (2005)** Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system *Brain. Res Brain Res Rev* 49:211-226
- Martinez-Fuentes AJ, Hu L, Krsmanovic LZ, Catt KJ (2004)** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression and membrane signaling in early embryonic GnRH neurons: role in pulsatile neurosecretion. *Mol Endocrinol* 18:1808-1817
- Maruska KP, Tricas TC (2007)** Gonadotropin-releasing hormone and receptor distributions in the visual processing regions of four coral reef fishes. *Brain Behav Evol* 70:40-56
- Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS 3rd, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH (1986)** A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234:1366-1371
- Mathias JR, Ferguson KL, Clench MH (1989)** Debilitating "functional" bowel disease controlled by leuprolide acetate, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog. *Dig Dis Sci* 34:761-766
- Matsumoto AM, Bremner WJ (1984)** Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 58:609-614
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV (1971)** Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339
- Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S (1995)** Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 9:2646-2658
- Maya-Núñez G, Conn PM (1999)** Transcriptional regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene is mediated in part by a putative repressor element and by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element. *Endocrinology* 140:3452-2458
- Maya-Núñez G, Conn PM (2003)** Transcriptional regulation of the GnRH receptor gene by glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 200:89-98
- McArdle CA, Franklin J, Green L, Hislop JN (2002)** Signalling, cycling and desensitisation of gonadotropin-releasing hormone receptors. *J Endocrinol* 173:1-11
- McCue JM, Quirk CC, Nelson SE, Bowen RA, Clay CM (1997)** Expression of a murine gonadotropin-releasing hormone receptor-luciferase fusion gene in transgenic mice is diminished by immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 138:3154-3160
- McGillivray SM, Bailey JS, Ramezani R, Kirkwood BJ, Mellon PL (2005)** Mouse GnRH receptor gene expression is mediated by the LHX3 homeodomain protein. *Endocrinology* 146:2180-2185
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990)** immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10

**Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Katz A (2001)** A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9636-9641

**Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR (2004)** Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25:235-275

**Miller WL, Huang ES (1985)** Secretion of ovine luteinizing hormone in vitro: differential positive control by 17 beta-estradiol and a preparation of porcine ovarian inhibin. *Endocrinology* 117:907-911

**Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM (1985)** Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* 313:231-233

**Miyamoto K, Hasegawa Y, Minegishi T, Nomura M, Takahashi Y, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1982)** Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 107:820-827

**Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1984)** Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3874-3878

**Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989)** Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574

**Morale MC, Batticane N, Bartoloni G, Guarcello V, Farinella Z, Galasso MG, Marchetti B (1991)** Blockade of central and peripheral luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors in neonatal rats with a potent LHRH-antagonist inhibits the morphofunctional development of the thymus and maturation of the cell-mediated and humoral immune responses. *Endocrinology* 128:1073-1085

**Morales P (1998)** Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Biol Reprod* 59:426-430

**Morales P, Pasten C, Pizarro E (2002)** Inhibition of in vivo and in vitro fertilization in rodents by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Biol Reprod* 67:1360-1365

**Moretti RM, Montagnani Marelli M, Van Groeninghen JC, Limonta P (2002)** Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3791-3797

**Morgan K, Sellar R, Pawson AJ, Lu ZL, Millar RP (2006)** Bovine and ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-II ligand precursors and type II GnRH receptor genes are functionally inactivated. *Endocrinology* 147:5041-5051

**Moss RL, McCann SM (1973)** Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 181:177-179

**Moumni M, Kottler ML, Counis R (1994)** Nucleotide sequence analysis of mRNAs predicts that rat pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptor proteins have identical primary structure. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1359-1366

**Mullen RD, Colvin SC, Hunter CS, Savage JJ, Walvoord EC, Bhangoo AP, Ten S, Weigel J, Pfäffle RW, Rhodes SJ (2007)** Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:190-195

**Münz H, Claas B, Stumpf WE, Jennes L (1982)** Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleostean fishes. *Cell Tissue Res* 222:313-323

**Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K (2008)** Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 199:105-112

**Nam DH, Lee SH, Kim HS, Lee GS, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2005)** The role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor in development of porcine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. *Theriogenology* 63:190-201

**Naor Z, Benard O, Seger R (2000)** Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11:91-99

**Naor Z (2009)** Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* 30:10-29

**Navratil AM, Knoll JG, Whitesell JD, Tobet SA, Clay CM (2007)** Neuroendocrine plasticity in the anterior pituitary: gonadotropin-releasing hormone-mediated movement in vitro and in vivo. *Endocrinology* 148:1736-1744

**Neill JD, Duck LW, Sellers JC, Musgrove LC (2001)** A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun* 282:1012-1018

**Ngan ES, Cheng PK, Leung PC, Chow BK (1999)** Steroidogenic factor-1 interacts with a gonadotrope-specific element within the first exon of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene to mediate gonadotrope-specific expression. *Endocrinology* 140:2452-2462

**Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T (2003)** Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6:1255-1263

**Norwitz ER, Cardona GR, Jeong KH, Chin WW (1999)** Identification and characterization of the gonadotropin-releasing hormone response elements in the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem* 274:867-880

**Norwitz ER, Xu S, Xu J, Spiryda LB, Park JS, Jeong KH, McGee EA, Kaiser UB (2002)** Direct binding of AP-1 (c-FOS/c-JUN) proteins to a SMAD binding element facilitates both gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- and activin-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *J Biol Chem* 277:37469-37478

**Ogren SO, Kuteeva E, Elvander-Tottie E, Hökfelt T (2010)** Neuropeptides in learning and memory processes with focus on galanin. *Eur J Pharmacol* 626:9-17

**Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001)** Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617

**Oikawa M, Dargan C, Ny T, Hsueh AJ (1990)** Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 127:2350-2356

**Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau US (2008)** Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 20:732-742

**Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Kronen A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, Taketo MM, Kemler R, Grosschedl R, Rose D, Li X, Rosenfeld MG (2006)** Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* 125:593-605

**Onitsuka C, Yamaguchi A, Kanamaru H, Oikawa S, Takeda T, Matsuyama M (2009)** Molecular cloning and expression analysis of a GnRH-like dodecapeptide in the swordtip squid, *Loligo edulis*. *Zoolog Sci* 26:203-208

**Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000)** Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745

**Palmon A, Ben Aroya N, Tel-Or S, Burstein Y, Fridkin M, Koch Y (1994)** The gene for the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone is expressed in the mammary gland of lactating rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4994-4996

**Palovcik RA, Phillips MI (1986)** A biphasic excitatory response of hippocampal neurons to gonadotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 44:137-141

**Park M, Shin E, Won M, Kim JH, Go H, Kim HL, Ko JJ, Lee K, Bae J (2010)** FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 24:1024-1036

**Pask AJ, Kanasaki H, Kaiser UB, Conn PM, Janovick JA, Stockton DW, Hess DL, Justice MJ, Behringer RR A (2005)** novel mouse model of hypogonadotrophic hypogonadism: N-ethyl-N-nitrosourea-induced gonadotropin-releasing hormone receptor gene mutation. *Mol Endocrinol* 19:972-981

**Pawson AJ, Katz A, Sun YM, Lopes J, Illing N, Millar RP, Davidson JS (1998)** Contrasting internalization kinetics of human and chicken gonadotropin-releasing hormone receptors mediated by C-terminal tail. *J Endocrinol* 156:R9-12

**Pawson AJ, Maudsley S, Morgan K, Davidson L, Naor Z, Millar RP (2005)** Inhibition of human type I gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) function by expression of a human type II GnRHR gene fragment. *Endocrinology* 146:2639-2649

**Pawson AJ, Faccenda E, Maudsley S, Lu ZL, Naor Z, Millar RP (2008)** Mammalian type I gonadotropin-releasing hormone receptors undergo slow, constitutive, agonist-independent internalization. *Endocrinology* 149:1415-1422

**Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang HJ, Miller WL, Mellon PL (2001)** Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142:2284-2295

**Perrin MH, Bilezikjian LM, Hoeger C, Donaldson CJ, Rivier J, Haas Y, Vale WW (1993)** Molecular and functional characterization of GnRH receptors cloned from rat pituitary and a mouse pituitary tumor cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 191:1139-1144

**Pfaff DW (1973)** Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* 182:1148-1149

**Phillis JW, Kirkpatrick JR (1980)** The actions of motilin, luteinizing hormone releasing hormone, cholecystokinin, somatostatin, vasoactive intestinal peptide, and other peptides on rat cerebral cortical neurons. *Can J Physiol Pharmacol* 58:612-623

**Pincas H, Forrai Z, Chauvin S, Laverriere JN, Counis R (1998)** Multiple elements in the distal part of the 1.2 kb 5'-flanking region of the rat GnRH receptor gene regulate gonadotrope-specific expression conferred by proximal domain. *Mol Cell Endocrinol* 144:95-108

**Pincas H, Amoyel K, Counis R, Laverriere JN (2001a)** Proximal cis-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:319-337

**Pincas H, Laverriere JN, Counis R (2001b)** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulate the promoter activity of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene via a bipartite response element in gonadotrope-derived cells. *J Biol Chem* 276:23562-23571

**Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2010)** Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Prog Brain Res* 181:55-77

**Pitteloud N, Hayes FJ, Dwyer A, Boepple PA, Lee H, Crowley WF Jr (2002)** Predictors of outcome of long-term GnRH therapy in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4128-4136

**Plowman PN, Nicholson RI, Walker KJ (1986)** Remission of postmenopausal breast cancer during treatment with the luteinising hormone releasing hormone agonist ICI 118630. *Br J Cancer* 54:903-909

**Poletti A, Rampoldi A, Piccioni F, Volpi S, Simeoni S, Zanisi M, Martini L (2001)** 5Alpha-reductase type 2 and androgen receptor expression in gonadotropin releasing hormone GT1-1 cells. *J Neuroendocrinol* 13:353-357

**Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003)** Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13:226-234

**Prange-Kiel J, Rune GM (2006)** Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138:765-772

**Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008)** Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol* 180:417-246

**Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Jarry H, Rune GM (2009)** Estrus cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm* 116:1417-1425

**Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain JC (1999)** Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94:809-819

**Quintanar JL, Salinas E, González R (2007)** Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in cerebral cortical neurons of embryos and adult rats. *Neurosci Lett* 411:22-25

**Quintanar JL, Salinas E (2008)** Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos. *Neurochem Res* 33:1051-1056

**Quintanar JL, Salinas E, González R (2009)** Gonadotropin-releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats. *Neurosci Lett* 461:21-24

**Quintanar JL, Salinas E, Quintanar-Stephano A (2011)** Gonadotropin-releasing hormone reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Neuropeptides* 45:43-48

**R****adovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, Notides AC, Rahman A, Weintraub BD, Cutler GB Jr, Wondisford FE (1991)** Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J Clin Invest* 88:1649-1655

**Raetzman LT, Ward R, Camper SA (2002)** Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordial. *Development* 129:4229-4239

**Raga F, Casañ EM, Kruessel JS, Wen Y, Huang HY, Nezhat C, Polan ML (1998)** Quantitative gonadotropin-releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod* 59:661-669

**Raga F, Casañ EM, Kruessel J, Wen Y, Bonilla-Musoles F, Polan ML (1999)** The role of gonadotropin-releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. *Endocrinology* 140:3705-3712

**Rajendren G, Moss RL (1993)** The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res* 617:81-86

**Re M, Pampillo M, Savard M, Dubuc C, McArdle CA, Millar RP, Conn PM, Gobeil F Jr, Bhattacharya M, Babwah AV (2010)** The human gonadotropin releasing hormone type I receptor is a functional intracellular GPCR expressed on the nuclear membrane. *PLoS One* 5:e11489

**Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ (1992)** Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 267:21281-21284

**Reinhart J, Xiao S, Arora KK, Catt KJ (1997)** Structural organization and characterization of the promoter region of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 130:1-12

**Renaud LP, Martin JB, Brazeau P (1975)** Depressant action of TRH, LH-RH and somatostatin on activity of central neurones. *Nature* 255:233-235

**Resuehr D, Wildemann U, Sikes H, Olcese J (2007)** E-box regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in immortalized gonadotrope cells. *Mol Cell Endocrinol* 278:36-43

**Reubi JC, Palacios JM, Maurer R (1987)** Specific luteinizing-hormone-releasing hormone receptor binding sites in hippocampus and pituitary: an autoradiographical study. *Neuroscience* 21:847-856

**Reynaud R, Saveanu A, Barlier A, Enjalbert A, Brue T (2004)** Pituitary hormone deficiencies due to transcription factor gene alterations. *Growth Horm IGF Res* 14:442-448

**Robison RR, White RB, Illing N, Troskie BE, Morley M, Millar RP, Fernald RD (2001)** Gonadotropin-releasing hormone receptor in the teleost *Haplochromis burtoni*: structure, location, and function. *Endocrinology* 142:1737-1743

**Rodin DA, Lalloz MRA, Clayton RN (1988)** Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone  $\beta$ -subunit gene expression in the male rat. *Endocrinology* 125:1282-1289

**Roelle S, Grosse R, Aigner A, Krell HW, Czubayko F, Gudermann T (2003)** Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 278:47307-47318

**Romanelli RG, Barni T, Maggi M, Luconi M, Failli P, Pezzatini A, Pelo E, Torricelli F, Crescioli C, Ferruzzi P, Salerno R, Marini M, Rotella CM, Vannelli GB (2004)** Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration. *J Biol Chem* 279:117-126

**Rosati F, Sturli N, Cungi MC, Morello M, Villanelli F, Bartolucci G, Finocchi C, Peri A, Serio M, Danza G (2011)** Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 124:77-83

**Roy D, Angelini NL, Belsham DD (1999)** Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* 140:5045-5053

**Sadie H, Styger G, Hapgood J (2003)** Expression of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene in alpha T3-1 gonadotrope cells is stimulated by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and protein kinase A, and is modulated by Steroidogenic factor-1 and NUR77. *Endocrinology* 144:1958-19571

**Sakuma Y, Pfaff DW (1980)** LH-RH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature* 283:566-567

**Santacana M, de la Vega AG, Heredia M, Valverde F (1996)** Presence of LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone) fibers in the optic nerve, optic chiasm and optic tract of the adult rat Brain. *Res Dev Brain Res* 91:292-299

**Sari IP, Rao A, Smith JT, Tilbrook AJ, Clarke IJ (2009)** Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 150:5549-5556

**Savoy-Moore RT, Schwartz NB, Duncan JA, Marshall JC (1980)** Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209:942-944

**Schumacher M, Guennoun R, Robel P, Baulieu EE (1997)** Neurosteroids in the Hippocampus: Neuronal Plasticity and Memory. *Stress* 2:65-78

**Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989)** Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-164

**Scully KM, Rosenfeld MG (2002)** Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295:2231-2235

**Sealfon SC, Laws SC, Wu JC, Gillo B, Miller WL (1990)** Hormonal regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors and messenger RNA activity in ovine pituitary culture. *Mol Endocrinol* 4:1980-1987

**Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH (2003)** The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627

**Servili A, Lethimonier C, Lareyre JJ, López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ, Kah O, Muñoz-Cueto JA (2010)** The Highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology* 151:2265-2275

**Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H (1996)** Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* 272:1004-1007

**Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H (1997)** Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278:1809-1812

**Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W (1983)** Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2794-2798

**Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, Okamoto S, Minokoshi Y, Suita S, Morohashi K (2005)** Ventromedial hypothalamic nucleus-specific enhancer of *Ad4BP/SF-1* gene. *Mol Endocrinol* 19:2812-2823

**Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalt TA, Drouin J, Morohashi K (2008)** Pituitary homeobox 2 regulates *adren4 binding protein/steroidogenic factor-1* gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol* 22:1633-1646

**Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O, et al (1995)** Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the *Ftz-F1* disrupted mice. *Dev Dyn* 204:22-29

**Short RA, Bowen RL, O'Brien PC, Graff-Radford NR (2001)** Elevated gonadotropin levels in patients with Alzheimer disease. *Mayo Clin Proc* 76:906-909

**Silveira LF, Stewart PM, Thomas M, Clark DA, Bouloux PM, MacColl GS (2002)** Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR "knockout". *J Clin Endocrinol Metab* 87:2973-2977



- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E (1993)** A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* 12:2735-2747
- Simonneaux V, Ribelayga C (2003)** Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55:325-395
- Skinner DC, Malpaux B, Delaleu B, Caraty A (1995)** Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology* 136:3230-3237
- Skinner DC, Albertson AJ, Navratil A, Smith A, Mignot M, Talbott H, Scanlan-Blake N (2009)** Effects of gonadotrophin-releasing hormone outside the hypothalamic-pituitary-reproductive axis. *J Neuroendocrinol* 21:282-292
- Skyrner MJ, Sim JS, Herbison AE (1999a)** Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140:5195-5201
- Skyrner MJ, Slater R, Sim JA, Allen ND, Herbison AE (1999b)** Promoter transgenics reveal multiple gonadotropin-releasing hormone- $\alpha$ -expressing cell populations of different embryological origin in mouse brain. *J Neurosci* 19:5955-5966
- Sloop KW, Parker GE, Hanna KR, Wright HA, Rhodes SJ (2001)** LHX3 transcription factor mutations associated with combined pituitary hormone deficiency impair the activation of pituitary target genes. *Gene* 265:61-69
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA (2005)** Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686-3692
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA (2006)** KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18:298-303
- Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carrière C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG (1996)** Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-333
- Spergel DJ, Krüth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH (1999)** GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19:2037-2050
- Stallings NR, Hanley NA, Majdic G, Zhao L, Bakke M, Parker KL (2002)** Development of a transgenic green fluorescent protein lineage marker for steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* 16:2360-2370
- Standaert FE, Chew BP, De Avila D, Reeves JJ (1992)** Presence of luteinizing hormone-releasing hormone binding sites in cultured porcine lymphocytes. *Biol Reprod* 46:997-1000
- Steger DJ, Hecht JH, Mellon PL (1994)** GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin  $\alpha$ -subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol Cell Biol* 14:5592-5602
- Stell WK, Walker SE, Chohan KS, Ball AK (1984)** The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoryretinal pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:940-944
- Stewart AJ, Katz AA, Millar RP, Morgan K (2009)** Retention and silencing of prepro-GnRH-II and type II GnRH receptor genes in mammals. *Neuroendocrinology* 90:416-432
- Suh H, Gage PJ, Drouin J, Camper SA (2002)** Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129:329-337
- Sundaresan S, Colin IM, Pestell RG, Jameson JL (1996)** Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. *Endocrinology* 137:304-311
- Susa T, Sato T, Ono T, Kato T, Kato Y (2006)** Cofactor CLIM2 promotes the repressive action of LIM homeodomain transcription factor Lhx2 in the expression of porcine pituitary glycoprotein hormone  $\alpha$  subunit gene. *Biochim Biophys Acta* 1759:403-409
- Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG (1999)** Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* 13:484-494

**Tajima T, Ohtake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K (2009)** OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 94:314-319

**Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA (1998)** Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125:4835-4840

**Tan L, Rousseau P (1982)** The chemical identity of the immunoreactive LHRH-like peptide biosynthesized in the human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 109:1061-1071

**Tanriverdi F, Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM (2003)** The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol* 176:293-304

**Thaler JP, Lee SK, Jurata LW, Gill GN, Pfaff SL (2002)** LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* 110:237-249

**Thomas P, Mellon P, Turgeon JL, Waring DW (1996)** The L $\beta$ T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology* 137:2979-2989

**Tieva A, Wilkström P, Olofsson JI, Bergh A, Damber JE (1999)** Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA in the rat ventral prostate and dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration. *Prostate* 39:101-107

**Tiong J, Locastro T, Wray S (2007)** Gonadotropin-releasing hormone-1 (GnRH-1) is involved in tooth maturation and biomineralization. *Dev Dyn* Nov 236:2980-2992

**Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG. (1998)** Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12:1691-1704

**Tremblay JJ, Drouin J (1999)** Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Mol Cell Biol* 19:2567-2576

**Tsai PS, Zhang L (2008)** The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol Reprod* 79:798-805

**Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ (2000)** A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275:661-667

**Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ (2010)** Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 31:284-295

**Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealton SC (1992)** Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6:1163-1169

**Tsutsumi M, Laws SC, Rodic V, Sealton SC (1995)** Translational regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor in alpha T3-1 cells. *Endocrinology* 136:1128-1136

**Tureck RW, Mastroianni L, Blasco L, Strauss JF (1982)** Inhibition of human granulosa cell progesterone secretion by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1078-10780

**Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL (1996)** Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol* 10:439-450

**Twan WH, Hwang JS, Lee YH, Jeng SR, Yueh WS, Tung YH, Wu HF, Dufour S, Chang CF (2006)** The presence and ancestral role of gonadotropin-releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinology* 147:397-406

**Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE (2009)** Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* 4:e8400

**Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Leanos-Miranda A, Conn PM (2004)** Misrouted cell surface GnRH receptors as a disease aetiology for congenital isolated hypogonadotrophic hypogonadism. *Hum Reprod Update* 10:177-192

**Umino O, Dowling JE (1991)** Dopamine release from interplexiform cells in the retina: Effects of GnRH, FMRFamide, bicuculine, and enkephalin on horizontal cell activity. *J Neurosci* 11:3034-3046

**Urs AN, Dammer E, Sewer MB (2006)** Sphingosine regulates the transcription of CYP17 by binding to steroidogenic factor-1. *Endocrinology* 147:5249-5258

**Vacher P (1995)** Gn-RH agonists in the treatment of prostatic carcinoma. *Biomed Pharmacother* 49:325-331

**Vereczki V, Köves K, Csáki A, Grósz K, Hoffman GE, Fiskum G (2006)** Distribution of hypothalamic, hippocampal and other limbic peptidergic neuronal cell bodies giving rise to retinopetal fibers: anterograde and retrograde tracing and neuropeptide immunohistochemical studies. *Neuroscience* 140:1089-1100

**Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA (2006)** Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology* 147:1654-1663

**Viger RS, Guittot SM, Anttonen M, Wilson DB, Heikinheimo M (2008)** Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol Endocrinol* 22:781-798

**von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Böttner M, Rune GM (2006)** Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18:847-856

**Walker SE, Stell WK (1986)** Gonadotropin-releasing hormone (GnRF), molluscan cardioexcitatory peptide (FMRFamide), enkephalin and related neuropeptides affect goldfish retinal ganglion cell activity. *Brain Res* 384:262-273

**Wang L, Chadwick W, Park SS, Zhou Y, Silver N, Martin B, Maudsley S (2010)** Gonadotropin-releasing hormone receptor system: modulatory role in aging and neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:651-660

**Wang QF, Farnworth PG, Findlay JK, Burger HG (1988)** Effect of purified 31K bovine inhibin on the specific binding of gonadotropin-releasing hormone to rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 123:2161-2166

**Watanabe YG (1982)** Effects of brain and mesenchyme upon the cyto genesis of rat adeno hypophysis in vitro. I. Differentiation of adrenocorticotropes. *Cell Tissue Res* 227:257-266

**Watanobe H (2002)** Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol* 545:255-268

**Webber KM, Stocco DM, Casadesus G, Bowen RL, Atwood CS, Preville LA, Harris PL, Zhu X, Perry G, Smith MA (2006)** Steroidogenic acute regulatory protein (StAR): evidence of gonadotropin-induced steroidogenesis in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 1:14

**Webber KM, Perry G, Smith MA, Casadesus G (2007)** The contribution of luteinizing hormone to Alzheimer disease pathogenesis. *Clin Med Res* 5:177-183

**Weesner GD, Becker BA, Matteri RL (1997)** Expression of luteinizing hormone-releasing hormone and its receptor in porcine immune tissues. *Life Sci* 61:1643-1649

**Weesner GD, Matteri RL (1994)** Rapid communication: nucleotide sequence of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor cDNA in the pig pituitary. *J Anim Sci* 72:1911

**Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P (1992)** Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol* 13:95-119

**Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001)** Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76:1879-1886

**Wen S, Schwarz JR, Niculescu D, Dinu C, Bauer CK, Hirdes W, Boehm U (2008)** Functional characterization of genetically labeled gonadotropes. *Endocrinology* 149:2701-2711

**Wen S, Ai W, Alim Z, Boehm U (2010)** Embryonic gonadotropin-releasing hormone signaling is necessary for maturation of the male reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16372-16277

**White BR, Duval DL, Mulvaney JM, Roberson MS, Clay CM (1999)** Homologous regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene is partially mediated by protein kinase C activation of an activator protein-1 element. *Mol Endocrinol* 13:566-577

**White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998)** Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:305-309

**Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SG (1995)** Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 136:172-179

**Wilson AC, Salamat MS, Haasl RJ, Roche KM, Karande A, Meethal SV, Terasawa E, Bowen RL, Atwood CS (2006)** Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *J Endocrinol* 191:651-663

**Wilson MD, Barbosa-Morais NL, Schmidt D, Conboy CM, Vanes L, Tybulewicz VL, Fisher EM, Tavaré S, Odom DT (2008)** Species-specific transcription in mice carrying human chromosome 21. *Science* 322:434-438

**Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL (1990)** Cell Lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:597-603

**Winkler N, Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR (2010)** Gonadotropin releasing hormone antagonists suppress aromatase and anti-Müllerian hormone expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 94:1832-1839

**Winters SJ, Ghooray D, Fujii Y, Moore Jr JP, Nevitt JR, Kakar SS (2007)** Transcriptional regulation of follistatin expression by GnRH in mouse gonadotrope cell lines: evidence for a role for cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 271:45-54

**Wirsig-Wiechmann CR (2001)** Function of gonadotropin-releasing hormone in olfaction. *Keio J Med* 50:81-85

**Wirsig-Wiechmann CR, Wiechmann AF (2002)** Vole retina is a target for gonadotropin-releasing hormone. *Brain Res* 950: 210-217

**Witkin JW (1987)** Immunocytochemical demonstration of luteinizing hormone-releasing hormone in optic nerve and nasal region of fetal rhesus macaque. *Neurosci Lett* 79:73-77

**Wolfahrt S, Kleine B, Rossmanith WG (1998)** Detection of gonadotrophin releasing hormone and its receptor mRNA in human placental trophoblasts using in-situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod* 4:999-1006

**Wolfe MW, Call GB (1999)** Early growth response protein 1 binds to the luteinizing hormone- $\beta$  promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated gene expression. *Mol Endocrinol* 13:752-763

**Wong M, Eaton MJ, Moss RL (1990)** Electrophysiological actions of luteinizing hormone-releasing hormone: intracellular studies in the rat hippocampal slice preparation. *Synapse* 5:65-70

**Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990)** Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10:4035-4039

**Wu S, Wilson MD, Busby ER, Isaac ER, Sherwood NM (2010)** Disruption of the single copy gonadotropin-releasing hormone receptor in mice by gene trap: severe reduction of reproductive organs and functions in developing and adult mice. *Endocrinology* 151:1142-1152

**Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M (1992)** A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131:2812-2820

**Xu C, Xu XZ, Nunemaker CS, Moenter SM (2004)** Dose-dependent switch in response of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons to GnRH mediated through the type I GnRH receptor. *Endocrinology* 145:728-735

**Yang SN, Lu F, Wu JN, Liu DD, Hsieh WY (1999)** Activation of gonadotropin-releasing hormone receptors induces a long-term enhancement of excitatory postsynaptic currents mediated by ionotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 260:33-36

**Yao B, Huang W, Huang Y, Chui Y, Wang Y, Li H, Pu R, Wan L, Zhang R (2003)** A study on the localization and distribution of GnRH and its receptor in rat submaxillary glands by immunohistochemical, in situ hybridization and RT-PCR. *Life Sci* 72:2895-2904

**Yasin M, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Kerrigan JR, Marshall JC (1995)** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol. *Endocrinology* 136:1559-1564

**Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM (1997)** Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1023-1028

**Yue Y, Chen ZY, Gale NW, Blair-Flynn J, Hu TJ, Yue X, Cooper M, Crockett DP, Yancopoulos GD, Tessarollo L, Zhou R (2002)** Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10777-10782

**Zhang L, Tello JA, Zhang W, Tsai PS (2008)** Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 156:201-209

**Zhao L, Bakke M, Parker KL (2001)** Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 185:27-32

**Zhao Y, Mailloux CM, Hermes E, Palkóvits M, Westphal H (2010)** A role of the LIM-homeobox gene *Lhx2* in the regulation of pituitary development. *Dev Biol* 337:313-323

**Zhou W, Sealfon SC (1994)** Structure of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene: variant transcripts generated by alternative processing. *DNA Cell Biol* 13:605-614

**Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG (2007)** Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87:933-963